

**Die Rolle von Aminopeptidasen in der MHC Klasse I Antigenprozessierung
des HLA-A2-restringierten HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops
im Zusammenhang mit dem *peptide-loading complex***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Sabrina Urban
geboren am 6. März 1980 in Potsdam

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Klotzel
 2. PD Dr. Annette Paschen
 3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2009

Abstract (ger.)

Das Ubiquitin Proteasom System generiert die Mehrheit der antigenen Peptide, die zusammen mit MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden, wobei durch Kooperation mit alternativen proteolytischen Systemen die Vielfalt der möglichen MHC I Liganden erhöht wird. In diesem Zusammenhang, insbesondere im Rahmen einer Immunantwort, ist die Rolle von Aminopeptidasen bislang nur ungenügend charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der modulatorische Einfluss von zytosolischen und im ER lokalisierten Aminopeptidasen auf die Generierung des HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops durch Prozessierung von proteasomal generierten Peptidprodukten untersucht. Dafür wurde in pp65 exprimierenden Zellen die Expression einzelner Aminopeptidasen mittels siRNA inhibiert und der Effekt auf die Epitopräsentation über die Aktivierung pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL bestimmt.

Es zeigte sich, dass TPPII, LAP, AP-B und POP durch Degradation antigenen pp65 Peptide im Zytosol limitierend auf die Epitopräsentation wirken. Damit wurden die Peptidasen AP-B und POP erstmalig in direkten Zusammenhang mit der MHC Klasse I Antigenprozessierung gebracht. Analysen weiterer zytosolischer Peptidasen wie TOP, BH und PSA zeigten keinen signifikanten Effekt auf die pp65 Epitopräsentation, so dass diese Peptidasen an der zellulären Prozessierung des pp65 Antigens nicht beteiligt sind. Die Trimmaktivität von ERAPI und ERAPII im ER hingegen hatte einen bedeutenden Anteil an der pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitopgenerierung.

In Immunpräzipitationsexperimenten konnte zudem die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem *peptide-loading complex* zum ersten Mal nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten geben Hinweise darauf, dass die Interaktion von ERAPI und ERAPII mit dem Komplex unabhängig von dessen vollständiger Assemblierung mit dem TAP Transporter stattfinden kann und vermutlich über Tapasin vermittelt wird. Da diese Assoziation durch IFNgamma induziert wird, könnte sie zu einer effizienteren Antigenprozessierung und -Präsentation, vor allem unter Infektionsbedingungen, beitragen.

Schlagwörter

Antigenprozessierung / Aminopeptidasen / HCMV pp65 / Proteasom

Abstract (eng.)

The ubiquitin proteasome system is responsible for the generation of the majority of MHC class I presented antigenic peptides. By cooperation with alternative proteolytic systems the diversity of MHC class I ligands is increased. In this context, especially during immune response, the role of aminopeptidases is barely characterised.

In this project the effect of cytosolic and ER-resident aminopeptidases on processing of proteasomal generated peptides was investigated with regard to HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ epitope generation.

Therefore, expression level of single aminopeptidases was down regulated by siRNA in pp65 expressing cells and the effect of down regulation on epitope presentation was analysed by activation of pp65₄₉₅₋₅₀₃ specific CTLs.

It could be demonstrated that TPPII, LAP, AP-B and POP have negative effects on pp65 epitope presentation. With AP-B and POP two additional cytosolic aminopeptidases with a functional role in epitope processing were identified. Other aminopeptidases, that have been characterised as part of the antigen processing machinery, namely TOP, BH and PSA, did not affect pp65 epitope generation. In contrast, trimming by ERAPI and ERAPII in the ER resulted in an efficient epitope presentation.

For the first time, experimental evidence was provided that the two ER-resident peptidases interact with the MHC class I peptide-loading complex (PLC). The obtained results indicate that this association takes place independently of the assembly of the entire complex including TAP and is probably mediated by tapasin. The observation that this complex formation is inducible by IFN γ suggests that the association of ERAPI and ERAPII to the PLC accounts for a better antigen processing and presentation mainly at the site of infection.

keywords

antigen processing / aminopeptidases / HCMV pp65 / proteasome

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Der MHC Klasse I Antigenprozessierungs- und Präsentationsweg.....	3
1.1.1 Das Ubiquitin Proteasom System	3
1.1.2 Die Zelloberflächenpräsentation.....	6
1.1.3 Der MHC Klasse I <i>peptide-loading complex</i>	9
1.2 Aminopeptidasen	12
1.2.1 Zytoplasmatische Aminopeptidasen.....	13
1.2.2 Aminopeptidasen im ER.....	14
1.3 Die virale Infektion	18
1.3.1 Das humane Zytomegalievirus	18
1.4 Ziel der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Zellkulturreagenzien.....	22
2.1.2 Enzyme / Substrate / Antikörper.....	22
2.1.3 Plasmide.....	23
2.1.4 siRNA	24
2.1.5 PCR Primer.....	25
2.1.6 Synthetische HCMV pp65 Peptide.....	25
2.1.7 Chemikalien / Verbrauchsmaterialien / Geräte.....	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellbiologische Methoden	27
2.2.2 Biochemische Methoden	30
2.2.3 Immunologische Methoden	33
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	35
2.2.5 Massenspektrometrie	37
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Proteasomale Prozessierung von pp65	38
3.2 Peptidtranslokation über den TAP Transporter in das ER	41
3.3 Etablierung stabil pp65 exprimierender HeLa^{A2+/pp65} Zellen	43
3.4 siRNA knockdown von zytoplasmatischen Aminopeptidasen führt zu einer erhöhten Epitoppräsentation	44
3.5 AP-B und POP schneiden vorwiegend im pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop	46
3.6 HeLa^{A2+} Transfektion mit 14mer Minigenkonstrukt	49

3.7	<i>siRNA knockdown von ER Aminopeptidasen führt zu einer verminderten CTL Stimulation.....</i>	51
3.8	<i>Einfluß IFNγ-induzierbarer Aminopeptidasen in Kooperation mit dem Immunoproteasom.....</i>	53
3.9	<i>Untersuchungen zur Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem MHC Klasse I peptide-loading complex.....</i>	55
3.9.1	Die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem PLC wird durch IFN γ induziert.....	56
3.9.2	Direkte Interaktion der ER Aminopeptidasen mit Tapasin.....	58
3.9.3	Die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem PLC erfolgt TAP-unabhängig	59
3.10	<i>HCMV pp65 Prozessierungsmodell.....</i>	61
4	Diskussion.....	63
4.1	<i>Die Prozessierung des HCMV Phosphoproteins pp65.....</i>	63
4.1.1	Das virale pp65 Protein wird durch das Immunoproteasom effizienter prozessiert	63
4.1.2	Nur kurze pp65 Peptide werden effizient über TAP in das ER transportiert.....	65
4.1.3	Aminopeptidasen beeinflussen die pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ Epitopräsentation.....	67
4.1.4	Der Einfluß von Aminopeptidasen auf die pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ Epitopräsentation ist in Kooperation mit dem Immunoproteasom variabel	72
4.2	<i>Die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem peptide-loading complex</i>	73
4.2.1	ERAPI und ERAPII als Komponenten des MHC Klasse I <i>peptide-loading complex</i>	73
4.2.2	Mögliche Interaktionskomponenten des PLC für ERAPI und ERAPII.....	74
4.2.3	Mögliche Funktionen dieser Interaktion.....	77
5	Literaturverzeichnis	79
	Abkürzungsverzeichnis	90
	Danksagung.....	92
	Publikationen.....	93
	Erklärung.....	94

Zusammenfassung

Das Ubiquitin Proteasom System ist von entscheidender Bedeutung für die Generierung antigener Peptide, die im Kontext mit MHC Klasse I Molekülen dem zellulären Immunsystem präsentiert werden. Dabei wird durch alternative proteolytische Systeme, die kooperativ mit dem Proteasom oder unabhängig davon wirken, die Vielfalt der möglichen MHC Klasse I Liganden erhöht. Welche funktionelle Relevanz Aminopeptidasen durch N-terminales Trimmen im Zusammenhang mit der Antigenprozessierung haben, ist bisher nur teilweise untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Prozessierung des HCMV Phosphoproteins pp65 durch das Proteasom und weitere Proteasen analysiert. Der Schwerpunkt lag auf der Analyse des modulatorischen Einflusses von Aminopeptidasen im Zytosol und im ER auf die Generierung des HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops durch die Prozessierung proteasomaler Peptidprodukte. Dafür wurde in stabil pp65 exprimierenden Zellen die Expression einzelner Aminopeptidasen mittels siRNA inhibiert und der Effekt auf die pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation über die Aktivierung pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL bestimmt. Ein zentraler Aspekt war dabei die Analyse der Auswirkung einer verstärkten Peptidgenerierung durch das Immunoproteasom auf die Trimmaktivität der IFN γ -induzierbaren Aminopeptidasen LAP, ERAPI und ERAPII. Darüber hinaus wurden Interaktionsstudien zwischen den ER Aminopeptidasen und Komponenten des MHC Klasse I *peptide-loading complex* (PLC) durchgeführt, um der Frage der molekularen Mechanismen für ein effizientes Trimmen und Beladen von MHC Klasse I Liganden im ER nachzugehen.

Die zytosolischen Peptidasen TPPII und LAP üben einen stark negativen Einfluß auf die pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation aus. TPPII zerstört dabei vorrangig das proteasomal generierte 14mer Vorläuferpeptid, wohingegen LAP Präferenz für das 9mer Epitop aufweist. Die Aminopeptidasen POP und AP-B wurden erstmalig im Bezug zur Antigenprozessierung analysiert, wobei beide Peptidasen limitierend auf die Präsentation des pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops wirken. Für AP-B wurde *in vitro* eine atypische Schnittaktivität nachgewiesen, wodurch die Epitopzerstörung im zellulären System erklärt werden könnte. Die Untersuchungen zu den Peptidasen TOP, BH und PSA zeigten keinen signifikanten Effekt auf die pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation, so dass diese Peptidasen an der zellulären Prozessierung des pp65 Antigens nicht beteiligt sind. Einen bedeutenden Anteil an der Epitopgenerierung hingegen hat die nicht kooperative Trimmaktivität von ERAPI und ERAPII im ER. In Kombination mit dem erhöhten Substratumsatz durch das Immunoproteasom wurde aufgrund veränderter pp65₄₉₅₋₅₀₃ Präsentationseffekte der variable Einfluß der IFN γ -induzierbaren Aminopeptidasen auf die Antigenprozessierung deutlich.

Des Weiteren konnte mittels der durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente erstmalig die Assoziation beider ER Aminopeptidasen mit dem PLC nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten geben Hinweise darauf, dass die Interaktion von ERAPI und ERAPII mit dem PLC unabhängig von dessen vollständiger Assemblierung mit dem TAP Transporter stattfinden kann und vermutlich über

Tapasin vermittelt wird. Da diese Assoziation durch IFN γ induziert wird, könnte sie zu einer effizienteren Antigenprozessierung und -Präsentation vor allem unter Infektionsbedingungen beitragen.

Basierend auf den erzielten Erkenntnissen wird die wesentliche Bedeutung von Aminopeptidasen in der MHC Klasse I Antigenprozessierung zunehmend deutlich und bietet daher neue Ansatzpunkte für die Entwicklung therapeutischer Interventionen mit immunmodulatorischer Wirkung auf die pp65-spezifische Immunreaktion.

1 Einleitung

1.1 Der MHC Klasse I Antigenprozessierungs- und Präsentationsweg

Alle Proteine unterliegen einem kontinuierlichen Umsatz in der Zelle, wodurch die Aufrechterhaltung wichtiger biologischer Funktionen durch die Eliminierung defekter und anormaler Proteine gewährleistet wird. Darüber hinaus werden biologische Prozesse über den Abbau von Schlüsselproteinen reguliert, die Proteinneusynthese durch Wiederverwertung einzelner Aminosäuren gesichert sowie eine Peptidquelle für die Immunkontrolle bereitgestellt.

Über den MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Antigenprozessierungs- und Präsentationsweg wird ein Teil der durch Degradation zellulärer Proteine produzierten Peptide über TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das ER (*Endoplasmatisches Retikulum*) transportiert, dort an MHC Klasse I Moleküle gebunden und schließlich als MHC/Peptid Komplex auf der Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert. Das Immunsystem ist dadurch in der Lage, den Zustand einzelner Zellen durch die Erkennung der MHC/Peptid Komplexe zu überwachen und infizierte bzw. entartete Zellen zu identifizieren und selektiv zu eliminieren. Um eine verbesserte Generierung von MHC Klasse I präsentierten Peptiden zu erreichen, entwickelten sich Komponenten des Immunsystem, die die Aktivität dieser spezifischen Reaktionswege modifizieren.

1.1.1 Das Ubiquitin Proteasom System

Zellen degradieren ihre Proteine über zwei Hauptwege. Der lysosomale Abbauweg im endozytischen Kompartiment, vermittelt durch Lysosomen und späte Endosomen, ist für den Abbau von vielen Membran- und extrazellulären Proteinen verantwortlich, die über Endozytose in diese Vesikel gelangen. Darüber wird die Mehrheit der durch MHC Klasse II präsentierten Peptide generiert (Medd und Chain, 2000), wobei MHC Klasse II Moleküle fast ausschließlich auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), den Dendritischen Zellen, Makrophagen und B Zellen, exprimiert werden.

Der proteasomale Abbau im Zytosol und Kern degradiert den Großteil der zellulären Proteine und generiert die Mehrheit der mit MHC Klasse I präsentierten Peptide (Rock *et al.*, 1994; Kloetzel, 2004b). Dieser Abbauweg beinhaltet ATP-abhängige Prozesse wie die Proteinmarkierung durch Ubiquitin und die Hydrolyse durch das 26S Proteasom – das Ubiquitin Proteasom System (UPS).

Aufbau und Struktur des Proteasoms

Das Proteasom wurde als hochmolekulare komplexe Protease mit multikatalytischer Funktion beschrieben (Hilt und Wolf, 1995). Dieser ATP-abhängige Proteinasekomplex gehört zur Familie der Amino-terminal-nukleophilen (Ntn-) Hydrolasen (Bochtler *et al.*, 1999) und ist für den Großteil der nicht-

lysosomalen Lyse in eukaryotischen Zellen verantwortlich. Proteasomen sind im Zytoplasma, Kern und am ER lokalisiert (Wojcik und DeMartino, 2003) und können bis zu 1% des löslichen Proteins einer Zelle ausmachen (Tanaka *et al.*, 1986).

Obwohl den drei katalytischen β Untereinheiten (UE) charakteristische Schnittspezifitäten zugeordnet werden (Dahlmann *et al.*, 1986; Dick *et al.*, 1998; Orlowski und Wilk, 2000), kann das Proteasom (**Abb.1.1**) Substrate nach nahezu jeder beliebigen Aminosäure spalten (Wenzel *et al.*, 1994). Durch Typ I und II Interferon wird die Assemblierung des Immunoproteasoms (iP) induziert (Groettrup *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2006), wobei die Feinstruktur des gesamten 20S Proteasoms sowie die Schnittpräferenzen durch den Austausch der aktiven konstitutiven β UE gegen die Immununtereinheiten verändert werden. Es wurde gezeigt, dass nicht die katalytische Aktivität einer Immununtereinheit, sondern deren vermittelte strukturelle Eigenschaften für die Epitopgenerierung entscheidend sein kann (Sijts *et al.*, 2000a). Aufgrund dessen wird durch die Produktion einer größeren Vielfalt von Peptiden eine verbesserte Immunantwort ermöglicht. In professionellen APC stellt das iP den dominierenden Proteasomentyp dar, wobei das Standardproteasom (sP) nie vollständig ersetzt wird (Macagno *et al.*, 1999). Die Expression des iP in nicht-lymphoiden Organen geht nach Infektion kaum über 60% der gesamten Proteasomenpopulation hinaus (Strehl *et al.*, 2006).

Die proteasomale Reaktivität wird ferner über die Bindung regulatorischer Komplexe wie 19S und PA28 an die äußeren α Ringe beeinflusst (**Abb.1.1**). Das 20S Proteasom kann sowohl allein (Coffino, 2001) als auch Regulator-assoziiert (Kloetzel, 2001) Substrate abbauen. Dabei degradiert das 20S Proteasom unmarkierte Proteine ATP-unabhängig. Das 26S Proteasom kann ebenfalls Substrate über einen Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus degradieren. Der proteasomale Abbau der Ornithin-Decarboxylase wird beispielsweise über Antizym vermittelt (Murakami *et al.*, 1992; Zhang, M. *et al.*, 2003).

Proteasomale Funktion – die Rolle in der Antigenprozessierung

Die regulierte Proteindegradation durch das UPS spielt eine entscheidende Rolle bei einer großen Vielfalt von essentiellen zellulären Prozessen (Coux *et al.*, 1996; Glickman und Ciechanover, 2002). Das Proteasom ist für den selektiven Abbau von zelleigenen Proteinen, wie z.B. Zyklinen (Hershko *et al.*, 1991), verantwortlich und besitzt daher wichtige Funktionen in der Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung, Regulation der Apoptose und zellulären Stressantwort. Durch die Prozessierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B (Palombella *et al.*, 1994), und Signalproteinen ist das Proteasom in die Proteinexpression und Signaltransduktion involviert. Zusätzlich ist die proteasomale Proteolyse an der Steuerung metabolischer Wege beteiligt. Eine wesentliche Rolle übernimmt das Proteasom in der MHC Klasse I Antigenpräsentation durch die Generierung antigenener Peptide, die zur Immunreaktion gegenüber T Zellen präsentiert werden können (Goldberg und Rock, 1992; Rock *et al.*, 1994; Goldberg *et al.*, 2002). Aufgrund der starken Verknüpfung dieser Prozesse können Defekte im UPS zu schwerwiegenden Störungen der zellulären Homöostase führen und neurologische Störungen, maligne Entartungen sowie Autoimmunität verursachen (Golab *et al.*, 2004; Wang und Maldonado, 2006).

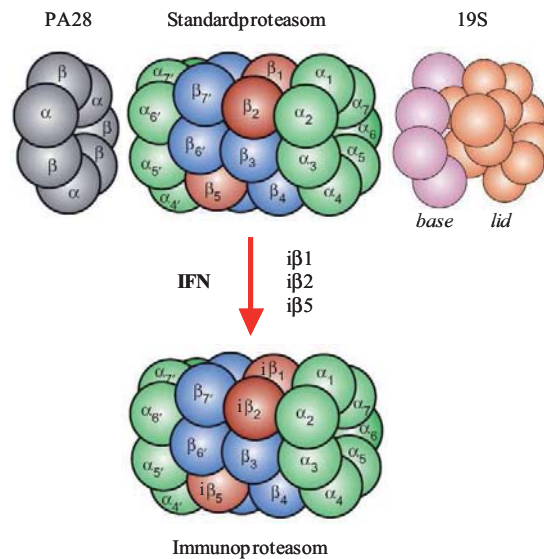


Abb.1.1: Aufbau des Proteasoms und der Regulatoren PA28 und 19S. Das 20S Proteasom besteht aus 14 verschiedenen Untereinheiten (UE), die ein Dimer aus heptameren $\alpha\beta$ Ringen bilden, so dass jede UE zweifach im 20S $\alpha\beta\alpha$ Komplex integriert ist. Die zwei äußeren Ringe aus α_1 - α_7 UE (grün) bilden eine Pore, über die der Substrateintritt sowie die Freisetzung der Produkte reguliert wird (Voges *et al.*, 1999). Drei der β_1 - β_7 UE (blau und rot), β_1 , β_2 und β_5 (rot), der inneren Ringe besitzen unterschiedliche Peptidaseaktivitäten und bilden das katalytische Zentrum. Durch IFN wird die Assemblierung des Immunoproteasoms induziert, wobei die homologen Immununtereinheiten $i\beta_1$, $i\beta_2$ und $i\beta_5$ präferenziell in den Komplex eingebaut werden (Frentzel *et al.*, 1994). PA28 (grau) ist ebenfalls durch IFN γ induzierbar. Der heptamere Ring aus drei PA28 α und vier PA28 β UE bindet an die α Ringe des 20S Proteasoms und aktiviert durch Öffnen der Pore den Komplex. Der 19S Regulator besteht aus zwei Subkomplexen: der *base* Komplex, der an die α Ringe des 20S Proteasoms bindet, ist aus sechs verschiedenen ATPasen der TripelA-Familie (lila) und zwei nicht ATPase UE (braun) aufgebaut; der *lid* Komplex besteht aus bis zu zehn verschiedenen nicht ATPase UE (braun) und dient der Substraterkennung. Durch Assemblierung zweier 19S Regulatoren mit dem 20S Proteasom entsteht das 26S Proteasom (Peters, J. M. *et al.*, 1993), das unter ATP-Verbrauch Ubiquitin-markierte Proteine degradiert (Hough *et al.*, 1986; Hershko und Ciechanover, 1998). Durch Assoziation des 20S Proteasoms mit beiden Regulatoren PA28 und 19S entsteht das sogenannte Hybridproteasom (Tanahashi *et al.*, 2000), das mit einer verbesserten Antigenprozessierung in Zusammenhang gebracht wird (Kruger *et al.*, 2003; Klotzel, 2004b). (Abbildung abgeändert nach (Klotzel, 2001,2004b).)

Die für eine regulatorische Funktion erforderliche Spezifität der proteasomalen Proteolyse wird durch Ubiquitin vermittelt. Ubiquitin ist ein hochkonserviertes kleines Protein aus 76As im Zytoplasma und Kern aller eukaryotischen Zellen (Wilkinson *et al.*, 1980). Durch die Modifizierung mit Polyubiquitin innerhalb einer ATP-abhängigen Enzymkaskade (Pickart und Eddins, 2004) werden Proteine für den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom markiert (Weissman, 2001). Dominierende Substrate für das Proteasom und damit die wichtigste Quelle für MHC Klasse I Peptidliganden stellen defekte Formen eines Genprodukts dar. Diese sogenannten DriPs (*defective ribosomal products*) werden sehr viel schneller als das native funktionelle Produkt degradiert (Reits, E. A. *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Yewdell, J., 2002). Auf diesem Weg können vor allem langlebige (virale) Antigene schnell und direkt dem MHC Klasse I präsentierenden System zugeführt werden, um eine effiziente Immunantwort zu ermöglichen (Khan *et al.*, 2001).

Das Proteasom produziert eine komplexe Menge überlappender Peptide eines Proteins. Dabei werden antigene Peptide nicht notwendigerweise jedes Mal produziert, wenn das Antigen degradiert wird (Rock *et al.*, 2002). Proteasomal werden Peptide von 3 bis 30As Länge (Kisselev *et al.*, 1999) produziert. Der

korrekte C-Terminus eines Epitops wird zumeist durch bevorzugte Schnitte nach hydrophoben oder basischen Aminosäuren generiert (Stoltze *et al.*, 1998), wodurch die Bindungspräferenzen des TAP Transporters und MHC Klasse I Molekülen bedient werden (van Endert *et al.*, 1995). Die Effizienz der C-terminalen Prozessierung wird zudem von der Sequenzumgebung beeinflusst (Mo *et al.*, 2000). Die Mehrzahl der MHC Klasse I Liganden wird als N-terminal verlängertes Vorläuferpeptid vom Proteasom gebildet (Kloetzel, 2001), so dass der N-Terminus meist postproteasomal durch die Trimmaktivität von Aminopeptidasen im Zytosol oder im ER generiert wird (Kloetzel und Ossendorp, 2004). N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide sind meist weniger anfällig für die Degradation durch Aminopeptidasen im Zytosol (Reits, E. *et al.*, 2004) und weisen häufig eine höhere Bindungsaffinität für den TAP Transporter auf. Für Epitope mit N-terminalem Prolin ist dies von besonderer Bedeutung, da Prolin in Position 2 den Transport durch TAP beeinträchtigt (Lauvau *et al.*, 1999; Serwold *et al.*, 2001). Daher stellen N-terminal verlängerte Versionen antigener Peptide die Hauptquelle für reife Epitope dar und *Trimming*-Enzyme, die finale MHC Klasse I Liganden generieren, spielen eine entscheidende Rolle für eine effiziente MHC Klasse I Präsentation.

Unter Infektionsbedingungen induziert das immunmodulatorische Zytokin IFN γ die Expression von Proteinen des MHC Klasse I präsentierenden Systems, wie z.B. den proteasomalen Immununtereinheiten, PA28, TAP und MHC Klasse I Molekülen. Dadurch wird nicht nur das Proteasom in seiner Struktur und Funktion im Sinne einer effizienteren Antigenprozessierung modifiziert. Die Induzierbarkeit durch IFN γ wird als kennzeichnende Eigenschaft von Proteinen mit wichtiger Funktion in der Antigenprozessierung angesehen. Im Vergleich zum sP besitzt das neu assemblierte iP veränderte Schnittpräferenzen (Morel *et al.*, 2000; Toes *et al.*, 2001) und generiert daher ein abweichendes Peptidspektrum mit qualitativen und vor allem quantitativen Auswirkungen. Für einige Antigene setzen sP und iP identische Schnitte mit unterschiedlicher Frequenz (Cardozo und Kohanski, 1998; Strehl *et al.*, 2008), wobei das iP vermehrt N-terminal elongierte Vorläuferpeptide produziert (Cascio *et al.*, 2001). Zudem kann die MHC Klasse I Präsentation von bestimmten viralen Epitopen durch das iP erhöht (Schwarz *et al.*, 2000; Sijts *et al.*, 2000b), die von zelleigenen bzw. Tumorepitopen jedoch inhibiert werden (Morel *et al.*, 2000; Van den Eynde und Morel, 2001; Cangemi *et al.*, 2003).

1.1.2 Die Zelloberflächenpräsentation

Die Effizienz, mit der ein Peptid präsentiert wird, ist zum einen von der Halbwertszeit des Proteins und zum andern von der Sequenzumgebung des Epitops abhängig, welche die Abbaurate sowohl des Proteasoms als auch von Amino- und Endopeptidasen beeinflusst (York *et al.*, 1999). Die Kinetik der konkurrierenden Prozesse – Generierung des finalen Epitops durch das Proteasom und *Trimming*-Enzyme einerseits und seine Degradation durch Peptidasen bevor Erreichen des TAP Transportes andererseits – bestimmen das Ausmaß der Epitoppräsentation. Dabei ist die Generierung antigener Peptide ein

stochastischer Prozess, dem die 99%ige Degradation der proteasomal produzierten Peptide durch zytosolische Aminopeptidasen entgegensteht (Reits, E. *et al.*, 2003).

Peptidtransport über TAP in das ER

Für die Bindung an MHC Klasse I Moleküle im ER werden die prozessierten Peptide mittels TAP Transporter (*transporter associated with antigen processing*) aus dem Zytosol über die ER-Membran transportiert. TAP gehört zu den ABC-Transportern (*ATP binding cassette*), die für den ATP-abhängigen Membrantransport von Ionen, Zuckermolekülen, Aminosäuren oder Peptiden verantwortlich sind (Higgins, 1992). TAP ist als Heterodimer aus den nicht-kovalent assoziierten UE TAP1 und TAP2 aufgebaut (Spies *et al.*, 1992), die durch IFN γ verstärkt exprimiert werden. Die Peptidbindung wird über die hydrophoben Transmembrandomänen beider UE realisiert und führt unter ATP-Verbrauch zur Konformationsänderung und Translokation des Peptids (Neumann und Tampe, 1999).

Aufgrund seiner Bindungspräferenzen nimmt der Transporter selektiven Einfluß auf die im ER zur Verfügung stehenden MHC Klasse I Liganden (Momburg *et al.*, 1994; Neefjes *et al.*, 1995; van Endert *et al.*, 1995). Peptidsubstrate von 8 bis 16 As Länge mit hydrophobem oder basischem C-Terminus werden durch TAP bevorzugt transportiert. Da zusätzlich die TAP Affinität über Interaktionen mit den drei N-terminalen Aminosäuren beeinflusst wird, können unter Umständen auch längere Polypeptide und Peptide mit sterisch ungünstigen Aminosäureresten wie Prolin und umfangreichen Modifikationen wie Fluoreszenzfarbstoffe transportiert werden (Koopmann *et al.*, 1996; Gromme *et al.*, 1997). Häufig werden N-terminal elongierte Vorläuferpeptide gegenüber dem entsprechenden Epitop bevorzugt durch TAP transportiert (Fruci *et al.*, 2003), wodurch Trimmprozesse sowohl im Zytosol als auch im ER für eine effiziente Epitoppräsentation notwendig werden.

Zusätzlich existieren alternative Wege, wie antigene Peptide in das ER gelangen können, so dass die Beladung verschiedener MHC Klasse I Moleküle auch TAP-unabhängig erfolgen kann (Zweerink *et al.*, 1993; Johnstone und Del Val, 2007). Solche MHC Klasse I Liganden stammen häufig aus Signalsequenzen von Proteinen, welche über die SRP (*signal recognition pore*) das ER erreichen (Wei und Cresswell, 1992).

MHC Klasse I Peptidbindung und Präsentation

MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Moleküle (im humanen System als HLA - *human leukocyte antigen* - bezeichnet) präsentieren hauptsächlich proteasomal generierte Peptide von zytosolischen und Kernproteinen. Diese Peptidprodukte können im Zytosol und auch nach Import im ER durch Aminopeptidasen auf ihre funktionelle Länge zurechtgeschnitten werden, um an MHC I zu binden. Das MHC Klasse I Transmembran-Glykoprotein ist ein Heterodimer, aufgebaut aus einer schweren α Kette, welche nicht kovalent mit der leichten Kette des invarianten β 2Mikroglobulin (β 2m) assoziiert ist. Die Expression ist durch IFN γ induzierbar. Die schwere Kette faltet sich in drei extrazelluläre Domänen α 1, α 2 und α 3 (Bjorkman *et al.*, 1987), wobei die α 1 und α 2 Domänen zusammen die geschlossene

Peptidbindungsgrube bilden und die Korezeptoren von T Zellen mit der $\alpha 3$ Domäne interagieren, die sogenannte MHC Restriktion. Der Polymorphismus der MHC Gene betrifft hauptsächlich die Aminosäurereste der Peptidbindungsgrube, wodurch eine enorme Vielfalt von Bindungsspezifitäten realisiert wird. MHC Klasse I Moleküle präsentieren kurze Peptide von 8 bis 10 AAs mit hydrophobem oder basischem C-Terminus, die zudem Haplotyp-spezifische Ankerreste in ihrem Bindungsmotiv aufweisen (Falk und Rotzschke, 1993; Rammensee *et al.*, 1993). Dabei werden der N- und C-Terminus des Peptids von invarianten Bereichen der Bindungsgrube gebunden und stellen daher wichtige Kontakte für eine stabile Bindung dar. Andere Bereiche der Bindungsgrube sind hochpolymorph, wodurch die Variabilität der Peptidsequenz und damit die spezifische Erkennung durch den T Zellrezeptor (TZR) ermöglicht wird. Die Peptidbeladung von MHC Klasse I Molekülen findet in Assoziation mit dem TAP Transporter im *peptide loading complex* (PLC) statt, wodurch die direkte Nähe zur Peptidquelle geschaffen wird. Durch Exozytose über den Golgi-Apparat und das *trans*Golgi-Netzwerk wird der MHC/Peptid Komplex an die Zelloberfläche gebracht, wo dieser über den spezifischen TZR von zytotoxischen CD8⁺ T Lymphozyten (CTL) der Immunabwehr erkannt wird. Die spezifische Bindung des TZR an den MHC/Peptid Komplex, unterstützt von kostimulatorischen Interaktionen, löst eine Kaskade von Signalreaktionen aus, die die Zellproliferation und Differenzierung bzw. die Etablierung der Effektorfunktionen einleiten. Durch die Aktivierung von zytotoxischen T Zellen wird die Sekretion der Zytokine IFN γ und IL2 sowie der zytotoxischen Proteine Perforin und Granulylin ausgelöst und folglich die Zielzelle lysiert. Durch direkte Interaktion über FAS und FAS Ligand erfolgt die Induktion der Apoptose in infizierten Zellen (Russell und Ley, 2002).

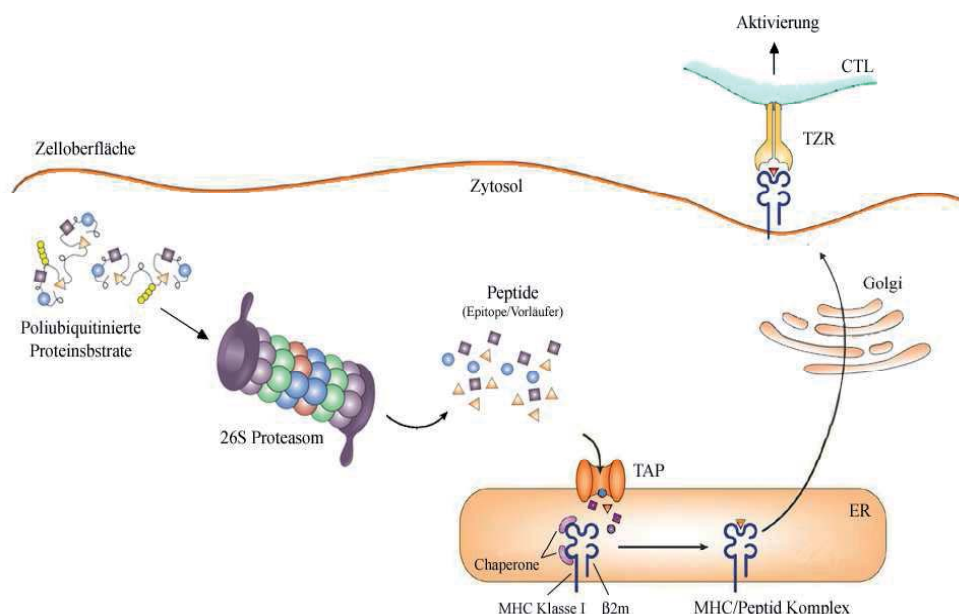


Abb.1.2: Der MHC Klasse I Antigenprozessierungs- und Präsentationsweg. Polibiquitinierte Proteinsubstrate sind für den Abbau durch das 26S Proteasom gekennzeichnet. Durch proteasomale Degradation entstehen Peptidfragmente – reife Epitope und Vorläuferpeptide, die über TAP in das ER transportiert werden können. Im ER binden antigene Peptide an das restringierte MHC Klasse I Molekül mit Hilfe von Chaperonen. Der assemblierte MHC/Peptid Komplex gelangt über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche zur Präsentation. Durch Interaktion über den spezifischen TZR wird die CD8⁺ T Zelle (CTL) aktiviert. (Abbildung abgeändert nach (Yewdell, J. W. *et al.*, 2003; Kloetzel, 2004a).)

1.1.3 Der MHC Klasse I *peptide-loading complex*

Der MHC Klasse I *peptide-loading complex* (PLC) wird über die Assemblierung des MHC/ β 2m Heterodimers mit TAP, Tapasin, Calretikulin sowie ERp57 gebildet und dient der Peptidbeladung naszierender MHC Klasse I Moleküle. Die Assemblierung, Stabilität und Funktion des PLC wird durch zahlreiche Interaktionen zwischen den Komponenten reguliert sowie durch INF γ induziert.

Die Komponenten des *peptide-loading complex*

Tapasin (Tpn) - abgeleitet von *TAP-associated glycoprotein* - stellt die zentrale Komponente des PLC dar. Die Expression dieses MHC Klasse I spezifischen Chaperons ist durch INF γ induzierbar. Interaktionen mit den einzelnen Komponenten des PLC finden über die N-terminal unstrukturierte und den zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen im ER sowie über die Transmembrandomäne und den kurzen zytoplasmatischen C-Terminus statt (Ortmann *et al.*, 1997).

Die ER Chaperone Calnexin (CNX) und Calretikulin (CRT) regulieren zusammen durch transiente Bindung an neu synthetisierte Proteine, die monoglukosylierte N-gebundene Glykane tragen, die Faltung von konventionellen Glykoproteinen im ER (Ellgaard und Helenius, 2001) und sorgen auf diese Art für die Retention fehlgefalteter Proteine (Ellgaard und Helenius, 2003). Die Thioredoxoreduktase ERp57 ist dabei für die Ausbildung von Disulfidbindungen (SSB) verantwortlich (Elliott, J. G. *et al.*, 1997). ERp57 gehört der Proteindisulfidisomerase Familie an, welche die Oxidation, Isomerisierung und Reduktion von SSB in neu synthetisierten Glykoproteinen katalysiert (Ellgaard und Ruddock, 2005), besitzt Chaperonaktivität und ist an der Ausbildung von intra- und intermolekularen SSB beteiligt. Die homologen Lektine CNX und CRT sind ebenso in die Faltung von MHC Klasse I Molekülen involviert. Das ER Transmembranprotein CNX bindet unmittelbar nach der Translokation an die MHC Klasse I schwere Kette und unterstützt deren Maturierung bis β 2m assoziiert. ERp57 katalysiert die intramolekulare Isomerisierung der SSB in der MHC α 2 und α 3 Domäne während der Faltung (Zhang, Y. *et al.*, 2006). Dann wird CNX gegen das luminal CRT ausgetauscht, welches die weitere Assemblierung fördert. CRT kontrolliert dabei den Glukosylierungsstatus von MHC I. Die Aktivität beider Chaperone ist von Calcium abhängig. CNX und CRT weisen luminal eine exponierte Prolin-reiche Haarnadelstruktur auf, die P-Domäne, über die die Interaktion mit dem C-Terminus von ERp57 stattfindet (Frickel *et al.*, 2002; Pollock *et al.*, 2004).

Interaktionen und Assemblierung des *peptide-loading complex*

Im PLC wird ein einfaches molekulares Verhältnis der einzelnen Komponenten angenommen, so dass über ein Tpn ein MHC/ β 2m Dimer, ein ERp57 und ein CRT in den Komplex gebunden sind. Mit wie vielen Tpn Molekülen ein TAP Heterodimer interagiert, ist jedoch umstritten (Ortmann *et al.*, 1997; Bangia und Cresswell, 2005; Rufer *et al.*, 2007).

Tpn als Kernstück des Komplexes fungiert als Bindeglied zwischen dem Peptidtransporter und den übrigen Komponenten. Tpn stabilisiert TAP über die Interaktion ihrer Transmembrandomänen (Koch und Tampe, 2006). ERp57 ist an Tpn stabil disulfidgebunden (Dick et al., 2002). CRT bindet über seine P-Domäne an ERp57 und Glykan-vermittelt an die MHC Klasse I schwere Kette. Tpn interagiert mit MHC I zum einen über die N-terminale Domäne mit einer exponierten Schleife der MHC $\alpha 2$ Domäne, zum anderen über die Membran-proximale Immunglobulin-ähnliche Domäne mit $\alpha 3$ (Wright et al., 2004) und zudem wahrscheinlich über zytoplasmatische Bereiche (Chambers et al., 2008).

Die Assemblierung der MHC Klasse I schweren Kette mit $\beta 2m$ und dem Peptid im PLC verläuft in mehreren Schritten (**Abb.1.2**). Dabei soll eine möglichst hohe Stabilität des ternären Komplexes durch die optimale Bindung von hoch affinen Peptiden erreicht werden, so dass das Peptid während des Transports nicht abdiffundiert und auf der Zelloberfläche langanhaltend präsentiert wird, um eine effiziente CTL Reaktion zu ermöglichen.

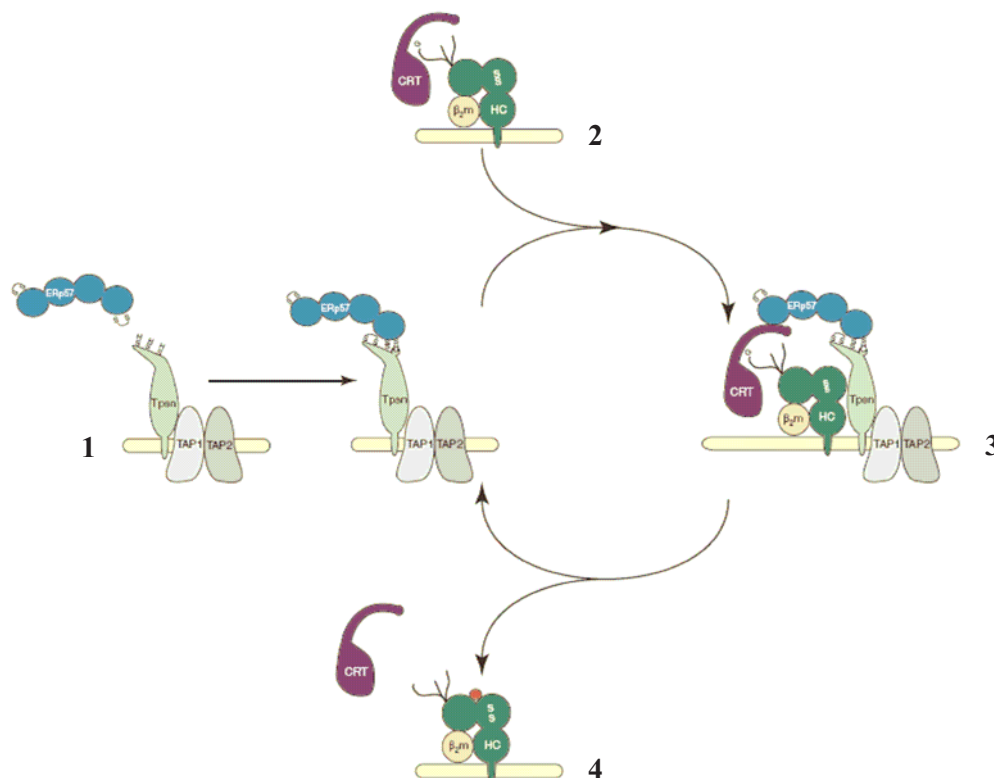


Abb.1.3: Die Assemblierung des MHC Klasse I *peptide loading complex* (PLC). Neu synthetisiertes Tapasin (Tpsn) assoziiert unmittelbar mit TAP (TAP1/2). Direkt danach wird ERp57 über Tapasin in den Komplex rekrutiert und kovalent gebunden (1). Parallel assoziiert das MHC/β2m Dimer (HC/β2m) nach erfolgreicher oxidativer Faltung mit CRT (2). Der durch Assoziation dieser beiden Subkomplexe vollständig assemblierte PLC (3) stabilisiert das unbeladene MHC Klasse I Molekül und ermöglicht über einen noch unvollständig verstandenen Tpn-abhängigen Mechanismus die Bindung hoch affiner Peptide (roter Punkt). Dies induziert die Freisetzung und Präsentation des MHC/Peptid Komplexes sowie die Dissoziation von CRT nach Deglukosylierung (4). Der Kernkomplex aus TAP/Tapasin/ERp57 ist dann in der Lage ein weiteres MHC Klasse I Molekül zu rekrutieren. (Abbildung aus (Cresswell *et al.*, 2005).)

Die Rolle des *peptide-loading complex* für die Peptidbeladung

Tpn ermöglicht die Assoziation von TAP, CRT und ERp57 mit MHC Klasse I Molekülen und erhöht das Expressionsniveau des Peptidtransporters sowie dessen Transportrate (Lehner *et al.*, 1998; Bangia *et al.*, 1999; Momburg und Tan, 2002), so dass in Abwesenheit von Tpn beides deutlich vermindert ist. Zudem werden unbeladene MHC Klasse I Moleküle durch Tpn in einem Peptid-rezeptiven Zustand stabilisiert und bis eine stabile Peptidbeladung erfolgt, im ER zurück gehalten (Schoenhals *et al.*, 1999). Tpn optimiert zusammen mit ERp57 die Peptidbindung (Wearsch und Cresswell, 2007) durch Selektion von möglichst affinen Peptiden (Elliott, T. und Williams, 2005). Durch den Peptidtransporter TAP wird die stetige Zufuhr von MHC Klasse I Liganden aus dem Zytosol gewährleistet und die Assoziation von ERp57 mit Tpn und MHC I verstärkt (Momburg und Tan, 2002).

Während die kovalente Bindung zwischen ERp57 und Tpn für eine optimale Funktion des PLC notwendig ist, ist die Redoxaktivität von ERp57 entbehrlich (Peaper und Cresswell, 2008a). Aufgrund der strukturell vermittelten Funktion ist ERp57 für die Assoziation von CRT und MHC I und daraus resultierend für die stabile Assoziation des PLC wichtig. Zudem ist in Abwesenheit von ERp57 oder CRT die Funktion von Tpn beeinträchtigt (Gao *et al.*, 2002; Garbi *et al.*, 2006).

Die Assemblierung von MHC I sowie die Peptidbindung sind ebenso von CRT und $\beta 2m$ abhängig. MHC Klasse I Moleküle, die nicht mit dem PLC interagieren, werden zumeist ineffizient mit Peptid beladen (Wright *et al.*, 2004). Diesbezüglich wurde für die Peptidbeladung unterschiedlicher MHC Klasse I Allele eine differenzierte Tpn-Abhängigkeit festgestellt (Peh *et al.*, 1998). Tpn-unabhängig sind MHC I Moleküle, die ohne Tpn effizient Peptide binden und präsentieren können und daher nicht die Assoziation mit dem PLC benötigen (Zernich *et al.*, 2004). Dahingegen sind Tpn-abhängige Allele in ihrer Zelloberflächenexpression ohne Tpn stark vermindert und weisen eine leicht abweichende Konformation ihrer Peptidbindungsgrube auf (Sieker *et al.*, 2007; Sieker *et al.*, 2008). Nur eine Aminosäure innerhalb der Bindungsgrube des MHC Klasse I Moleküls bestimmt diese Tpn-Abhängig- bzw. Unabhängigkeit (Park *et al.*, 2003).

Somit stabilisiert der *peptide-loading complex* MHC Klasse I Moleküle in einem Peptid-rezeptiven Zustand und belädt diese selektiv mit hoch affinen Peptiden, um eine hohe Stabilität des MHC/Peptid Komplexes zu erreichen. Wenn eine der PLC Komponenten fehlt oder durch Viren inhibiert wird, kann die Stabilität und damit die Expression und Funktion des MHC/Peptid Komplexes auf der Zelloberfläche aufgrund fehlgefalteter, degradierter oder wahllos beladener MHC Klasse I Moleküle beeinträchtigt werden.

1.2 Aminopeptidasen

Die MHC Klasse I Antigenprozessierung und -Präsentation ist ein wenig effizienter Vorgang (Princiotta *et al.*, 2003). Nur ein geringer Teil der proteasomalen Produkte besitzt die passende Länge für eine direkte MHC I Bindung und stellt reife Epitope dar. Die Mehrheit der generierten Peptide ist zu kurz (Toes *et al.*, 2001). Die übrigen längeren Produkte sind zumeist N-terminal verlängerte Epitopvorläufer, welche weiterer Trimmprozesse bedürfen und durch intrazelluläre Aminopeptidasen auf ihre korrekte Länge geschnitten werden müssen (**Abb.1.4**). Nahezu alle Peptide werden jedoch effizient im Zytosol zu einzelnen Aminosäuren abgebaut (Reits, E. *et al.*, 2003). Damit ist die Degradation von proteasomalen Produkten durch Aminopeptidasen ein bestimmender Faktor, der die Versorgung von Peptiden für die Antigenpräsentation limitiert. Besonders Metallopeptidasen wie die Thimet Oligopeptidase (TOP) (**Tab.1.1**) scheinen in diesen Prozess involviert zu sein (Saric *et al.*, 2004). Somit wird das Ausmaß der Antigenpräsentation von der Balance verschiedener proteolytischer Prozesse, die Epitope generieren oder zerstören, bestimmt.

Die Präsentation von vielen (viralen) Epitopen ist daher das Ergebnis des Zusammenspiels von verschiedenen proteolytischen Aktivitäten. Eine Beteiligung anderer proteolytischer Systeme an der Antigenprozessierung neben dem Proteasom wurde aufgrund der deutlich, jedoch nicht vollständig reduzierten MHC Klasse I Zelloberflächexpression nach Inhibition der proteasomalen Aktivität angenommen (Rock *et al.*, 1994; Luckey *et al.*, 1998). Derweil ist die Prozessierung durch nicht-proteasomale Proteasen weitläufig bekannt und alternative proteolytische Systeme für die Antigenprozessierung beschrieben worden (Del-Val und Lopez, 2002). Die alternativen Proteasen kooperieren einerseits mit dem Proteasom, wie z.B. Aminopeptidasen durch Trimmprozesse, oder agieren unabhängig vom Proteasom, z.B. die Signalpeptidase und die *trans*Golgi Protease Furin. Für einige Epitope bestimmter MHC Restriktion wurde eine Proteasom-unabhängige Prozessierung nachgewiesen (Benham *et al.*, 1998). Durch die Kooperation des Proteasoms mit anderen Proteasen wird eine höhere Diversität und Quantität an möglichen MHC Klasse I Liganden erreicht.

Aminopeptidasen sind ubiquitär, meist konstitutiv exprimiert und weisen partiell Redundanz in ihrer Funktion auf. Das N-terminale Trimmen durch Aminopeptidasen ist nicht nur essentiell für die Proteinmaturierung und -stabilität sowie für die Aktivierung, Modulation und Degradation von bioaktiven Peptiden, sondern auch für die MHC Klasse I Antigenprozessierung. Dadurch bestimmen die Peptidasen wesentlich, ob und in welchem Ausmaß eine Immunantwort gebildet wird (Rock *et al.*, 2004). Bisher sind die Bedeutung und spezifische Funktion der verschiedenen Aminopeptidasen in diesem Zusammenhang wenig verstanden. Für einige Aminopeptidasen – Tripeptidyl Peptidase II (TPPII), Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA), Bleomycin Hydrolase (BH) – wurde die direkte Beteiligung an der Generierung bestimmter MHC Klasse I Epitope nachgewiesen sowie für weitere durch IFN γ -induzierbare Peptidasen – Leucyl Aminopeptidase (LAP), ER Aminopeptidase I (ERAPI) und ERAPII – ebenfalls eine wesentliche Funktion in der MHC Klasse I Präsentation gezeigt (**Tab.1.1**). Die einzelnen Zusammenhänge der

verschiedenen Prozessierungsschritte innerhalb der Antigenpräsentation sind jedoch erst zum geringen Teil erfasst. So sind beispielsweise Metallopeptidasen der M1 Familie wie PSA, Aminopeptidase B (AP-B), ERAPI und ERAPII nicht in der Lage X-Pro-X Sequenzen zu schneiden, was für die Prozessierung von Epitopen mit dem X-Pro-X_n-Motiv entscheidend ist, da diese aufgrund ihrer geringen TAP Affinität als Vorläuferpeptide in das ER eingeschleust werden (Serwold *et al.*, 2001). Die Prolyl Oligopeptidase (POP) (**Tab.1.1**) ist eine der wenigen Peptidasen mit Schnittpräferenz nach Prolin. Des Weiteren ist die Kooperation von Aminopeptidasen im Zytosol und im ER beschrieben, wie z.B. für das HLA-A2-restringierte Epitop Tyr₃₆₉₋₃₇₇ des Tyrosinase Antigens (Altrich-VanLith *et al.*, 2006) und für das virale Epitop NP₁₄₇₋₁₅₅ des Influenza Virus Nukleoproteins (Guil *et al.*, 2006), wodurch die Komplexität zusätzlich erhöht wird.

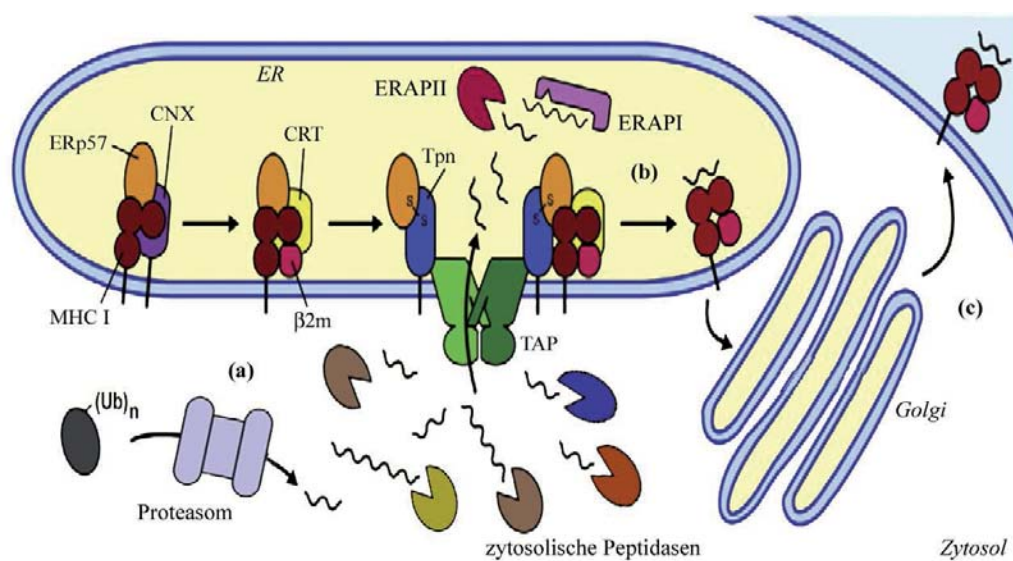


Abb.1.4: Der Einfluß von Aminopeptidasen in der MHC Klasse I Antigenprozessierung. Antigene Peptide, die durch das Ubiquitin Proteasom System gebildet werden, können durch zytosolische Peptidasen weiter prozessiert bzw. degradiert werden (a). Über den TAP Transporter gelangen dann die Peptide in das ER Lumen, wo diese durch die ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII getrimmt werden können (b). Final wird das generierte Epitop im MHC Klasse I *peptide-loading complex* auf MHC I Moleküle geladen und gelangt als MHC/Peptid Komplex über den Golgi Aparat an die Zelloberfläche (c). (Abbildung abgeändert nach (Procko und Gaudet, 2009).)

1.2.1 Zytosolische Aminopeptidasen

Aminopeptidasen im Zytosol dienen durch den Abbau von Peptiden vorrangig der Wiederverwertung von Aminosäuren. Verschiedene Aminopeptidasen wurden aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität im Zusammenhang mit der MHC Klasse I Antigenpräsentation beschrieben, wobei LAP eine der ersten Aminopeptidasen war, die in die Antigenprozessierung mit einbezogen wurden. LAP wurde als dominierende Trimmaktivität in zytosolischen Zellextrakten identifiziert (Beninga *et al.*, 1998) und ihre Expression als Typ I und II IFN induzierbar beschrieben (Shin *et al.*, 2007). Trotz der breiten Substratspezifität ist LAP für die Generierung der Mehrheit der MHC Klasse I präsentierten Peptide

generell ohne Bedeutung. So zeigten LAP-defiziente Mäuse keinerlei Veränderungen in ihrer Immunreaktion (Towne *et al.*, 2005).

TPPII hingegen, mit zwei verschiedenen proteolytischen Aktivitäten (Geier *et al.*, 1999), ist sowohl an Trimmprozessen von Vorläuferpeptiden beteiligt als auch aufgrund der endoproteolytischen Aktivität fähig, den korrekten C-Terminus von MHC Klasse I Liganden zu bilden (Seifert *et al.*, 2003), so dass TPPII unabhängig vom Proteasom Epitope generieren kann (Guil *et al.*, 2006). TPPII kann die Proteasomenfunktion bezüglich der Peptidversorgung für MHC I jedoch nicht kompensieren (Kessler *et al.*, 2003), hat aber einen wichtigen Anteil an der Modifizierung von proteasomalen Prozessierungsprodukten. Die Hemmung der TPPII Aktivität führt in vergleichbarem Maße wie eine Proteasominhibition zu einer nicht-additiven Reduktion der MHC I Zelloberflächenexpression (Reits, E. *et al.*, 2004). Folglich agieren beide Komplexe hauptsächlich sequenziell innerhalb eines proteolytischen Mechanismus. Darüber hinaus ist TPPII für die Präsentation einiger bestimmter vorrangig HLA-A3, A11, B35-restringierter Epitope wichtig. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass TPPII bei der Proteasom-unabhängigen Generierung von HLA-B27 Peptiden eine wesentliche Rolle zukommt (Marcilla *et al.*, 2008). In TPPII-defizienten Mäusen wurde zudem eine nur moderate, überwiegend destruktive Rolle für TPPII in der MHC Klasse I Antigenprozessierung beschrieben (Firat *et al.*, 2007a). Diese Tiere weisen jedoch multiple Krankheitssymptome sowie eine verminderte Lebenserwartung auf, so dass TPPII für die Aufrechterhaltung der normalen und systemischen Physiologie wichtig erscheint (Huai *et al.*, 2008). Demzufolge ist die Funktion von TPPII innerhalb der MHC Klasse I Antigenprozessierung weniger bedeutend als bisher angenommen.

TOP wird durch Degradation zytosolischer Peptide von 9 bis 17As zu 6 bis 9As für die Limitierung der Peptidzufuhr für die MHC I Bindung verantwortlich gemacht (Saric *et al.*, 2001), nimmt damit aber eine Schlüsselfunktion im Proteinabbau ein (Saric *et al.*, 2004). PSA und BH indessen sind zusammen an der postproteasomalen Prozessierung eines viralen MHC Klasse I Epitops des Vesikular Stomatitis Virus (VSV) direkt beteiligt (Stoltze *et al.*, 2000).

POP ist physiologisch im Metabolismus von verschiedenen Neuropeptiden des Zentralnervensystems relevant und daher in Gehirnfunktionen wie Lern- und Gedächtnisprozesse (Venalainen *et al.*, 2006) sowie in neurodegenerative Pathologien und psychiatrische Erkrankungen involviert. Für AP-B ist bisher neben der Prozessierung von bioaktiven Peptiden die Hydrolyse von Leukotrien (LT) A₄ zum proinflammatorische Mediator LT B₄ *in vitro* beschrieben worden (Cadel *et al.*, 1997).

1.2.2 Aminopeptidasen im ER

Im Lumen des ER wurden im humanen System bisher zwei proteolytische Aktivitäten identifiziert, die dort für das Trimmen von Vorläuferpeptiden essentiell sind (Hammer *et al.*, 2006) und eine entscheidende Funktion in der Elimination von Virus-infizierten und transformierten Zellen übernehmen.

Diese Mitglieder der Oxitokinase Subfamilie besitzen homologe Strukturen (Tsujimoto und Hattori, 2005) und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase verschiedener Prozesse wie Blutdruckregulation, Schwangerschaft, Gedächtnis und Antigenpräsentation.

Als erste enzymatische Trimmaktivität des ER wurde die ER Aminopeptidase I (ERAPI) isoliert (Saric *et al.*, 2002; Serwold *et al.*, 2002; York *et al.*, 2002), die zuvor als A-LAP (*adipocyte-derived leucine aminopeptidase*) beschrieben wurde (Hattori *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2000). Diese Aminopeptidase schneidet bevorzugt 9 bis 16As lange Peptidsubstrate C-terminal von großen hydrophoben Aminosäuren zu 8 oder 9meren (Chang *et al.*, 2005), kann prinzipiell aber alle N-terminalen Aminosäuren in Abhängigkeit von der Peptidsequenz entfernen (Evnouchidou *et al.*, 2008). Eine weitere proteolytische Aktivität im ER, die ER Aminopeptidase II (ERAPII), zuvor als L-RAP (*leukocyte-derived arginine aminopeptidase*) beschrieben, wurde bislang nur im humanen System identifiziert (Tanioka *et al.*, 2003). ERAPII weist beim N-terminalen Abspalten von basischen Dipeptiden entgegen ERAPI weder eine Präferenz für die Peptidlänge noch für den C-Terminus auf und reduziert damit teilweise die MHC Klasse I Antigenpräsentation durch Peptidtrimmen in zu kleine Produkte, die nicht mehr an MHC Klasse I Moleküle binden können. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifitäten zeigen ERAPI und ERAPII ergänzende Trimmaktivität und wirken, ein geringer Anteil im heterodimeren Komplex assoziiert (Saveanu *et al.*, 2005), besonders beim Prozessieren längerer Peptide zusammen. Bekräftigt wird diese Kooperation durch die additive Reduktion der MHC Klasse I Expression nach synchronem *knockdown* beider ER Aminopeptidasen, so dass ERAPI und II distinkte MHC Klasse I Ligandenpopulationen prozessieren und daher keine überlappenden Trimmaktivitäten angenommen werden (Saveanu *et al.*, 2005). Beispielsweise erfolgt in Abwesenheit der murinen ER Aminopeptidase ERAAP (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*) eine drastisch vermindert Präsentation von Epitopen mit X-Pro-X_n-Motiven (Hammer *et al.*, 2006), so dass zudem ein MHC I Allel-abhängiger Einfluss der ER Aminopeptidasen auf die Antigenpräsentation resultiert. Im Einzelnen zeigt der *knockdown/knockout* von ERAPI bzw. der analogen Peptidase ERAAP in der Maus variable Effekte auf die MHC Klasse I Präsentation (Hammer *et al.*, 2007a). Die MHC I Expression ist signifikant reduziert und ERAAP-defiziente Zellen zeigen eine verminderte Präsentation von selbst und fremd Antigen für CD8⁺ T Lymphozyten (Yan *et al.*, 2006). Dennoch erwies sich die Präsentation einiger Antigene als unverändert und die von anderen sogar als erhöht. Infektionsstudien belegen außerdem, dass ERAAP-defiziente Mäuse nur gering veränderte antivirale Immunreaktionen zeigen (Firat *et al.*, 2007b).

Für den molekularen Wirkmechanismus für ERAPI werden zwei gegenläufige Hypothesen kontrovers diskutiert. Der *molecular ruler* Mechanismus beschreibt ERAPI als eine einzigartige Peptidase, die ihre Substrate in einer langgestreckten Bindungsgrube sowohl C- als auch N-terminal bindet, wobei hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus streng bevorzugt werden (Chang *et al.*, 2005). Zudem wird eine Präferenz für Peptide von 9 bis 16As Länge demonstriert, die nur bis zu minimal 8mer Peptiden umgesetzt werden. Dieser Mechanismus wird durch Studien von Evnouchidou *et al.* unterstützt, die zeigten, dass die interne Peptidssequenz zusätzlichen Einfluß auf die Trimmaktivität von ERAPI ausübt

(Evnouchidou *et al.*, 2008). Dem entgegen steht die MHC-abhängige Trimmaktivität im ER (Paz *et al.*, 1999). Dieser Hypothese nach trimmt ERAAP an MHC gebundene Peptide, so dass MHC Klasse I Moleküle als Matrizen dienen, wodurch die Trimmaktivität von ERAAP auf die entsprechende Peptidlänge von 8 oder 9As limitiert und auch das Peptidrepertoire über Bindungsaffinitäten selektiert wird (Kanaseki *et al.*, 2006). Diese Darstellung basiert auf der Beobachtung, dass in Abwesenheit des restringierten MHC Klasse I Allels antigene Peptide durch ERAAP degradiert werden und postuliert eine direkte Assoziation der Peptidase mit dem MHC Klasse I Molekül. Für ERAPII wurde bisher kein molekularer Wirkmechanismus vorgestellt. Zudem ist die Funktion von ERAPII in der Antigenpräsentation noch ungenügend analysiert. Einheitlich wird ERAPI und ERAPII in der Prozessierung individueller Epitope eine kritische Rolle beigemessen, welche durch zytosolische Proteasen nicht kompensiert werden kann. Damit sind beide ER Aminopeptidasen durch finale Trimmprozesse für eine intakte Antigenpräsentation erforderlich.

Tab.1.1: Peptidasen im Überblick. (exo – exoproteolytische Aktivität (Trimmen); endo – endoproteolytische Aktivität; polyQ – poly-Glutamin; GnRH – *gonadotropin-releasing hormon*; As – Aminosäure; AP – Aminopeptidase)

Peptidase	kDa	Familie	IFN γ Induktion	Schnittpräferenz	physiologische Funktion / Substrate	Rolle in Antigenpräsentation / Beispiele	Besonderheiten
<i>zytosolisch</i>							
AP-B	73	M1 Metallo-Zink	-	Arg/Lys	Prozessierung von Glukagon, Angiotensin, Enkephalinen; Beteiligung an inflammatorischen Prozessen, Tumorentwicklung, Typ II Diabetes; Spermatogenese (Cadel <i>et al.</i> , 1995); unbekannt	unbekannt	Membran-assoziiert und sekretiert (Belhacene <i>et al.</i> , 1993);
BH	52	Cystein-Papain	-	exo – vielseitig endo – Arg (Koldanova <i>et al.</i> , 1998)	steht im Bezug zur Alzheimer-Krankheit (Lefterov <i>et al.</i> , 2000); unbekannt	BH-Defizienz in Maus ohne Folgen (Towne <i>et al.</i> , 2007); BH/LAP doppel- <i>knockout</i> Maus normal bis auf erhöhte CTL Reaktion gegen LCMV gp276 (Towne <i>et al.</i> , 2007); siehe PSA;	inaktiviert Bleomycin; Homohexamer mit aktiven Zentren ins Innere orientiert (Bromme <i>et al.</i> , 1996);
LAP	55	M17 Metallo-Zink	+ auch Typ I IFN (Shin <i>et al.</i> , 2007)	Leu	Endabbau von Peptiden zu resorbierbaren As; Prozessierung von Gluthation – Redoxstatus der Zelle (Cappiello <i>et al.</i> , 2006);	durch LAP-Überexpression reduzierte MHC I Expression (Reits, E. <i>et al.</i> , 2003); LAP-Defizienz in Maus ohne Folgen (Towne <i>et al.</i> , 2005); siehe BH;	Homohexamer (Matsui <i>et al.</i> , 2006);
POP	80	S9 Serin Endo	-	Pro/Ala	involviert in Transport-/ Sekretionsprozesse (Schulz <i>et al.</i> , 2005); Metabolismus von Neuropeptiden (Oxytocin); siehe TOP;	hydrolysiert Peptide <30As; degradiert CD4+ T Zellepitop von Gluten – vermindert Autoimmunreaktion in Zöliakie (Marti <i>et al.</i> , 2005);	im Nukleus und extrazellulär; β -Propeller Domäne reguliert Substratzugang (Fulop <i>et al.</i> , 1998);
PSA	103	M1 Metallo-Zink	-	basisch/hydrophob	Zellzykluskontrolle; Abbau von Enkephalinen; involviert in neurodegenerative Erkrankungen (Abbau von Tau (Karsten <i>et al.</i> , 2006) / polyQ (Bhutani <i>et al.</i> , 2007));	PSA-Defizienz in Maus ohne Folgen (Towne <i>et al.</i> , 2008); postproteasomales Trimmen von VSV NP ₅₂₋₅₉ zus. mit BH (Stoltze <i>et al.</i> , 2000); siehe TPPII;	Puromycin-sensitiv; im Nukleus und Membran-assoziiert; häufigste AP im Gehirn;
TOP	74	M3 Metallo-Zink Endo	- + in Maus-fibroblasten (Kim, S. I. <i>et al.</i> , 2003)	Met/Phe/Arg/Leu	Spermatogenese; Katabolismus zirkulierender Neuropeptide (Neurotensin, Bradykinin, Somatostatin); Metabolismus von GnRH zus. mit POP (Lew <i>et al.</i> , 1994);	strenge Präferenz für 6-17As Peptide; durch Inhibition von TOP erhöhte Antigenpräsentation (und umgekehrt) – für Zerstörung antigener Peptide verantwortlich (Sarić <i>et al.</i> , 2001; York <i>et al.</i> , 2003);	im Nukleus, Membran-assoziiert und sekretiert;
TPPII	135	S8 Serin-Subtilisin	-	exo – Phe/Ala endo – Lys/Arg	Kontrolle von Apoptose und Zellwachstum (Stavropoulou <i>et al.</i> , 2006);	Abbau von Peptiden >15As (Reits, E. <i>et al.</i> , 2004); agiert in Kooperation (RUI ₃₄₋₄₇ zus. mit PSA (Levy <i>et al.</i> , 2002)) und unabhängig (HIV Nef ₇₃₋₈₂ (Seifert <i>et al.</i> , 2003) / Influenza NP ₁₄₇₋₁₅₅ zus. mit ERAAP (Guil <i>et al.</i> , 2006)) vom Proteasom; wichtig für HLA-A3/A11/B35-restringierte Epitope;	Homooligomer; spaltet As-Triplets vom freien N-Terminus; generiert C-Terminus;
<i>ER</i>							
ERAPI	105	M1 Metallo-Zink Oxiokinase	+ auch Typ I IFN (Shin <i>et al.</i> , 2007)	Leu (hydrophob)	Blutdruckregulation (AngiotensinII, Kallidin) (Goto <i>et al.</i> , 2006); Angiogenese (Miyashita <i>et al.</i> , 2002); Lymphozytenentwicklung (Hammer <i>et al.</i> , 2007a);	strenge Präferenz für 9-16As Peptide mit hydrophobem C-Terminus (Chang <i>et al.</i> , 2005); prozessiert Vorläuferpeptide von gp100 und Ovalbumin <i>in vitro</i> ; für normale Antigenpräsentation essentiell – variable Effekte (Yan <i>et al.</i> , 2006; Hammer <i>et al.</i> , 2007a); siehe TPPII;	assoziiert z.T. mit ERAPII im heterodimeren Komplex (Saveanu <i>et al.</i> , 2005);
ERAPII	115	M1 Metallo-Zink Oxiokinase	+ variabel auch Typ I IFN (Shin <i>et al.</i> , 2007)	Arg/Lys (basisch)	Blutdruckregulation (AngiotensinII, Kallidin);	durch ERAPII-Inhibition MHC I Expression reduziert; prozessiert Vorläuferpeptide von gp100 und HIV Nef <i>in vitro</i> (Tanioka <i>et al.</i> , 2003);	differentielle Expression; spaltet basische Dipeptide vom N-Terminus; siehe ERAPI;

1.3 Die virale Infektion

Virale Infektionen stellen für das humane Immunsystem aufgrund der effizienten Replikation und Adaptivität von Viren eine besondere Herausforderung dar. Viren sind intrazelluläre Pathogene, die vorrangig über den MHC Klasse I Weg durch das Proteasom prozessiert werden und die adaptive zelluläre Immunabwehr induzieren. Für die Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien sind Kenntnisse über die Epitopgenerierung viraler Proteine sowie über die Induktion einer antiviralen Immunreaktion grundlegend, wobei die effiziente Präsentation viraler Antigene gegenüber CD8⁺ T Zellen entscheidend ist. Die Bedeutung von Aminopeptidasen innerhalb der Prozessierungsvorgänge von viralen Antigenen neben dem Proteasom ist nur wenig aufgeklärt, ein grundlegendes Verständnis jedoch Voraussetzung für eine erfolgreiche Modulation der antiviralen Immunreaktion.

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) verursacht eine weltweit verbreitete, in der Seroprävalenz zunehmende Infektion, für die gegenwärtig keine wirksame aktive Immunisierung zur Verfügung steht. Die Aufklärung der zellulären Prozessierung von HCMV Antigenen wie dem Phosphoprotein pp65, das eine starke CTL Reaktion induziert, kann daher zur Entwicklung therapeutischer Interventionen beitragen.

In dieser Arbeit diente das HCMV pp65 Protein als Modellantigen zur Untersuchung des Einflusses von Aminopeptidasen in der Generierung eines konkreten immundominanten Epitops.

1.3.1 Das humane Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zu den behüllten Viren der Familie der *β-Herpesviridae* (humaner Herpesvirus 5, HHV5) (Roizman *et al.*, 1981) mit einem linearen doppelsträngigen DNA-Genom von 230kb (**Abb.1.4**). Das Virus weist eine strenge Wirtsspezifität auf und wird über den Austausch von Körperflüssigkeiten bei engem Kontakt oder durch Bluttransfusionen und Transplantationen übertragen. Die Infektion führt zur Zellvergrößerung mit typischen intranukleären Einschlusskörperchen - „Eulenaugenzellen“ und wird gewöhnlich durch die angeborene und adaptive Immunität, die ineinander übergreifend und ergänzend agieren, effizient kontrolliert. Dabei ist die Zellvermittelte Immunantwort der dominierende Mechanismus, durch welchen die Ausbreitung des Virus kontrolliert wird. Dendritische Zellen (DC) erkennen virale Glykoproteine (Juckem *et al.*, 2008), prozessieren internalisierte Viruspartikel und präsentieren virale Antigene gegenüber spezifischen CTL (Arrode und Davrinche, 2003), welche infizierte Zellen direkt lysieren oder die Virusreplikation durch IFN γ Sekretion blockieren (Davignon *et al.*, 1996).

Bei immunkompetenten Individuen verläuft die HCMV Primärinfektion meist asymptomatisch oder als unspezifische „Viruserkrankung“ mit Fieber, die in seltenen Fällen auch die Symptomatik der infektiösen Mononukleose aufweist (Zaia, 1990). In immunologisch kompromittierten Patienten wie

Transplantationspatienten und HIV-Kranken hingegen kann HCMV schwerwiegende Komplikationen wie Pneumonie, Hepatitis und neurologische Erkrankungen auslösen, die zur Organabstoßung bzw. zum Tod führen können. Zudem ist HCMV als nach wie vor häufigste kongenitale Infektion für z.T. schwere embryofetale Missbildungen verantwortlich. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen HCMV Infektion und Ausbildung von malignen Tumoren gezeigt (Doniger *et al.*, 1999; Michaelis *et al.*, 2009).

Für den Nachweis einer HCMV Infektion stehen eine Vielzahl von labordiagnostischen Methoden zur Verfügung (Preiser *et al.*, 2004), jedoch ist gegenwärtig keine aktive Immunisierung gegen HCMV möglich, so dass neben Chemotherapeutika passiv übertragene Immunglobuline sowie spezifische Immuntherapien Anwendung finden.

HCMV zeichnet sich durch einen langsamen Replikationszyklus aus (Emery *et al.*, 1999) (**Abb.1.4C**). Ein Infektionszyklus unter Zellkulturbedingungen dauert von der Adsorption an die Zelle bis zur Freisetzung der Tochterviren ca. 72h. Das Virus repliziert vor allem in Zellen epithelialen, endothelialen und bindegewebigen Ursprungs (Plachter *et al.*, 1996) und persistiert lebenslang in Leber, Niere sowie lymphoretikulären Zellen. Das Virus etabliert dabei eine latente Infektion und wird sporadisch reaktiviert (Sinclair und Sissons, 2006). HCMV interferieren auf vielfältige Weise mit dem Antigen-präsentierenden System, um der Erkennung und vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Das Virus kodiert vielseitige Genprodukte mit immunmodulatorischer Funktion, die alle Kategorien der Immunabwehr beeinflussen: i) die MHC Funktion, ii) den Zellzyklus, iii) die Leukozytenaktivierung, iv) das Zytokinmilieu sowie v) die humorale Abwehr (Mocarski, 2004).

pp65 lower matrix protein

Das 65kDa Phosphoprotein (pp65; UL83) von HCMV ist der Hauptbestandteil des Teguments. Aufgrund der C-terminal enthaltenen NLS (*nuclear localisation signal*) Sequenz transloziert pp65 direkt nach der Infektion in den Zellkern (Schmolke *et al.*, 1995a). pp65 übernimmt bei der Virusreplikation keine essentielle Funktion (Schmolke *et al.*, 1995b), spielt jedoch bei der Assemblierung der Viruspartikel eine wichtige Rolle (Chevillotte *et al.*, 2008).

Während einer HCMV Primärinfektion wird pp65 bei der Viruspenetration aus dem Tegument ins Zytosol freigesetzt und ist somit der Antigenprozessierung unmittelbar zugänglich. Daher stellt pp65 ein dominierendes Antigen für die Aktivierung einer zellulären Immunantwort (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994) und der damit verbundenen frühen Kontrolle und Limitierung der Virusinfektion dar. 70 bis 90% aller HCMV spezifischen CD8⁺ T Zellen erkennen MHC Klasse I präsentierte pp65 antigene Peptide (Wills *et al.*, 1996), wobei diese häufig auf nur ein Peptid fokussiert sind (Weekes *et al.*, 1999). Ein solches immundominantes HLA-A2-restringiertes Epitop ist das Peptid pp65₄₉₅₋₅₀₃ NLVPMVATV. Die Präsentation dieses Epitops kann bei andauernder Infektion trotz HCMV-vermittelter Immunevasionsmechanismen detektiert werden (Besold *et al.*, 2007).

Das Phosphoprotein selbst vermittelt immunmodulatorische Effekte wie die Verminderung der MHC Klasse II Zelloberflächenpräsentation (Odeberg *et al.*, 2003), die Inhibition der Zellzytotoxizität von

Natürlichen Killer Zellen (Arnon *et al.*, 2005) sowie durch Inhibition der proteasomalen Prozessierung des HCMV IE1 Proteins (Gilbert *et al.*, 1996) die Beeinflussung des Zellzyklusses der Wirtszelle (Zhu *et al.*, 1995; Castillo und Kowalik, 2002).

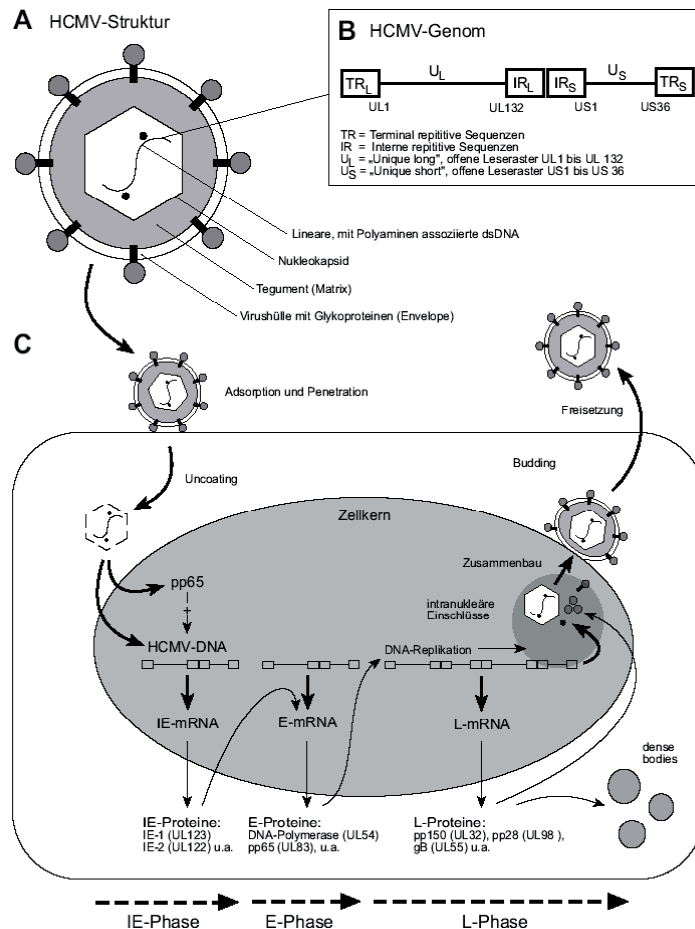


Abb.1.5: HCMV – Struktur, Genom, Replikation. Die charakteristische Morphologie der Herpesviren (A) zeigt das ikosaedrische Nukleokapsid, welches die DNA enthält, umgeben von einer amorphen Proteinmatrix, dem Tegument, welche wiederum von einer Virushülle nach außen abgeschlossen ist. Das Tegument besteht überwiegend aus Phosphoproteinen wie pp65. Die Strukturproteine des Teguments sind wichtig für die Disassemblierung bzw. Assemblierung des Virions und tragen regulatorische Funktionen während der frühen Phase der Replikation (Kalejta, 2008). Die Virushülle ist eine Lipiddoppelmembran abgeleitet von Vesikeln des Golgi-Apparats (Mettenleiter, 2002), in welche virale Glykoproteine eingelagert sind. Das Genom (B) des Zytomegalievirus besteht aus einem langen (*unique long* - UL) und einem kurzen (*unique short* - US) nicht-repetitiven Sequenzabschnitt, welche von invertierten Einheiten repetitiver Sequenzen separiert und flankiert werden (Chee und Barrell, 1990). Die Replikation (C) des Virus wird über die Adsorption viraler Glykoproteine an Rezeptoren der Wirtszelle eingeleitet. Nach Fusion der Membranen des Virus und der Zelle gelangt das Kapsid mit dem Tegument ins Zytolplasma (*uncoating*) und wird direkt zum Kern transportiert (Ogawa-Goto *et al.*, 2003), wo die Virus-DNA ins Nukleoplasma freigesetzt wird. Daraufhin erfolgt die kaskadenartig gestaffelte Transkription und Expression der sehr frühen (IE), frühen (E) und späten (L) Gene (Honess und Roizman, 1975). In der IE-Phase (0-3h pi) werden regulatorische Proteine exprimiert, die die Synthese der E-Proteine aktivieren. In der E-Phase (3-24h pi) werden neben regulatorischen Proteinen auch Glykoproteine sowie die DNA-Polymerase synthetisiert, zudem Proteine, die an verschiedenen Stellen mit der MHC Klasse I Antigenpräsentation interferieren. In der L-Phase (24-36h pi) setzt die Replikation der Virus-DNA ein und Strukturproteine werden gebildet. Nach Zusammenbau der Kapside im Zellkern gelangen diese durch Transknospung aus dem Kern und über das *trans*Golgi-Netzwerk zur Zelloberfläche. Mittels Exozytose werden die Tochterviren freigesetzt (*budding*), was mit der Zerstörung der infizierten Zelle einhergeht - lytische Infektion. (pi - *post infection*) (Abbildung übernommen aus <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hoffmeister-bodo-2003-10-20>.)

1.4 Ziel der Arbeit

Durch den Abbau zellulärer Proteine generiert das Ubiquitin Proteasom System antigene Peptide, die dem Immunsystem über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden. Der Beitrag von Aminopeptidasen an der Prozessierung antigener Peptide ist noch weitgehend ungeklärt – diese können das proteasomale System teilweise ersetzen oder aber mit diesem kooperativ zusammenarbeiten.

Gegenstand dieser Arbeit war daher die detaillierte Analyse der Prozessierung des HCMV pp65 Proteins mit Identifizierung beteiligter Proteasen. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Charakterisierung der für die Prozessierung des viralen immundominanten HLA-A2-restringierten pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops funktionell relevanten Aminopeptidasen. Es stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, welche Bedeutung einzelne Aminopeptidasen im Zytosol und im ER für die Generierung bzw. Zerstörung dieses pp65 Epitops haben und inwieweit diese Prozesse in Kooperation mit dem Immunproteasom modifiziert werden.

Zur Identifizierung möglicher Substrate der postproteasomalen Trimmaktivität von Aminopeptidasen wurden durch aufgereinigtes 20S Proteasom in *in vitro* Peptidverdauexperimenten generierte Produkte massenspektrometrisch auf N-terminal elongierte Epitopvorläuferpeptide analysiert. Um die zelluläre Prozessierung des viralen pp65 Proteins verfolgen zu können, wurde ein Zellsystem etabliert, das pp65 konstitutiv exprimiert. Die Funktion einzelner Aminopeptidasen, insbesondere INF γ -induzierbarer Metallopeptidasen, bezüglich der Epitopgenerierung wurde durch Inhibition der jeweiligen Aminopeptidaseexpression mittels spezifischer siRNA bestimmt und die potentiell veränderte Epitoppräsentation mittels pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer zytotoxischer T Lymphozyten detektiert. Hierbei sollte zunächst der Einfluß der bereits im Kontext der MHC Klasse I Antigenpräsentation beschriebenen zytosolischen Aminopeptidasen TPPII, LAP, PSA, BH und TOP sowie der ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII analysiert werden. AP-B und POP wurden als bisher an der Antigenprozessierung unbeteiligte Peptidasen in die Untersuchungen mit eingeschlossen.

Die ER Aminopeptidasen haben aufgrund ihrer effektiven Trimmaktivität eine besondere Rolle in der Antigenprozessierung, wobei umstritten ist, ob diese in Kooperation bzw. Assoziation mit MHC Klasse I Molekülen agieren. Daher sollte in weiterführenden Analysen mittels spezifischer Immunpräzipitationsexperimente eine mögliche Interaktion von ERAPI und ERAPII mit Komponenten des MHC Klasse I *peptide-loading complex* (PLC) nachgewiesen und damit der Wirkmechanismus der ER Aminopeptidasen näher definiert werden. Ziel war es, eine konkrete Aussage treffen zu können, ob ER Aminopeptidasen physikalisch mit dem PLC interagieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkulturreagenzien

Substanz	Hersteller
ISCOVE	Biochrom AG
OptiMEM (Transfektion)	Gibco
RPMI1640	Biochrom AG
AB-Serum (human)	PromoCell
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Ampicillin	Roth
Geneticin (G418)	Calbiochem
HygromycinB	Roche
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Puromycin	PAA Laboratories GmbH
Epoxomicin	Calbiochem
ProteaseinhibitorMix Complete™	Roche
humanes rekombinantes Interferon- γ (hrIFN γ)	Roche
Interleukin 2 (IL2)	ChironTherapeutics
Interleukin 15 (IL15)	R&D

2.1.2 Enzyme / Substrate / Antikörper

Methode	Enzym	Quelle
ELISA	HRP-Streptavidin	Mabtech
Klonierung	Restriktionsenzyme	New England Biolabs
	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche
	T4 DNA Ligase	New England Biolabs
	T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK)	New England Biolabs
RT-PCR	High Fidelity DNA Polymerase	Roche
	reverseTranscriptase	Roche

Methode	Substrat	Quelle
WB	ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham
Aktivität	H-Arg-AMC	Bachem
	Z-Gly-Pro-AMC	Bachem
ELISA	TMB Substrate Reagent Set	BD

Methode	Antikörper	Ursprung	Konzentration	Quelle
CTL	α CD3 (Okt3)		1 μ g/ μ l	Janssen-CILAG GmbH
FACS	α HLA-A2-FITC (HB82; BB7.2)		1mg/ml	Hybridom, ATCC
ELISA	α rhIFN γ mAk (1-D1K)	Maus	1mg/ml	Mabtech
	α rhIFN γ mAk (7-B6-1-Biotin)	Maus	1mg/ml	Mabtech
IP	α ERAPI (4D2)	Maus		(Saveanu <i>et al.</i> , 2005)
	α ERAPII (3F5)	Maus		(Saveanu <i>et al.</i> , 2005)
	α Tapasin „PaStaI“	Maus		(Dick <i>et al.</i> , 2002)
WB primär Ak				
	α Calnexin (c137)	Maus	1:15.000	BD
	α Calretikulin	Kaninchen	1:1.000	abcam
	α ERAPI (6H9)	Maus	1:1.000	(Saveanu <i>et al.</i> , 2005)
	α ERAPII	Ziege	1:2.000	R&D
	α ERp57	Maus	1:1.000	upstate
	α GAPDH	Kaninchen	1:10.000	Santa Cruz
	α LMP7 (K219)	Kaninchen	1:20.000	AG Klotzel
	α MECL1 (K223)	Kaninchen	1:5.000	AG Klotzel
	α MHC I (HC10)	Maus	1:10.000	(Lehner <i>et al.</i> , 1998)
	α PA28 γ	Kaninchen	1:2.000	CellSignaling
	α POP	Kaninchen	1:10.000	AG Klotzel
	α pp65	Maus	1:500	(Plachter <i>et al.</i> , 1990)
	α TAP1	Kaninchen	1:1.000	rockland.inc
	α Tapasin „STC2“	Kaninchen	1:500	(Tan <i>et al.</i> , 2002)
	α Ubiquitin (FK2)	Maus	1:2.000	Biomol
WB sekundär Ak				
	α Kaninchen-HRP	Ziege	1:10.000	Dianova
	α Maus-HRP	Schaf	1:10.000	Seramun
	α Ziege-HRP	Esel	1:5.000	Dianova

2.1.3 Plasmide

Das Plasmid pcDNA-pp65.35, zur Verfügung gestellt von Prof. B. Plachter (Johannes Gutenberg Universität Mainz), kodiert für die vollständige Sequenz des Phosphoproteins 65 (pp65) von HCMV und wurde zur Etablierung stabil pp65 exprimierender HeLa^{A2+/pp65} Zellen verwendet. Das 14mer Minigenkonstrukt wurde auf Grundlage des Plasmids pcDNA-pp65.35 mit Hilfe der Schnittstellen BamHI und XbaI in den Vektor pcDNA3.1zeo+ der Firma Invitrogen kloniert (Abschnitt 2.2.4.2). Das Resistenzplasmid pLXSH für Hygromycin wurde von Prof. E. Palmer (Universität Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt und bei der Generierung stabiler Zelllinien als Selektionsmarker kotransfiziert. Die entsprechenden Proteinsequenzen der verwendeten Plasmide sind in **Tab.2.1** aufgelistet.

Tab.2.1: NCBI Accession# der Proteine, die als Plasmide zur Etablierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und der Expression von POP dienen.

Protein	NCBI Accession#
HLA-A*0201	AY365426
LMP2 / iβ1	NM_002800
LMP7 / iβ5	NM_148919
MECL-1 / iβ2	NM_002801
pp65 (AD169)	X17403
POP	NM_002726

2.1.4 siRNA

Die in der vorliegenden Arbeit für Transfektionsexperimente verwendeten siRNA-Spezies der Firma eurogentec, aufgereinigt durch Gelfiltration, sind in **Tab.2.2** aufgelistet. Als Kontroll-siRNA wurde *siControl NON-Target plus* von Dharmacon verwendet.

Tab.2.2: Sequenzen der verwendeten siRNA Oligonukleotide

siRNA target	Duplex	Oligonukleotid (5' – 3')
AP-B	1	CGC CUG CUG UUA AAU ACA A
BH	1	CCA GAA GGA UGA AUG AUA U
	2	CGC UGU UAU UUC UUC UUG A
ERAPI	1	CGU AGU GAU GGG ACA CCA U
ERAPII	1	GCA GGC AUA UUG CAC UAU C
	2	GAA AGC UGC UGA ACU CUU C
	3	GAG UAG GUC UGA UUC AUG A
	4	GAU CAU CUC UGG CAC AAC A
LAP	1	CCC AGU CUU CUU GGA AAU UCA
POP	1	CCU CUU UGG UUG UGU UAU U
	2	GGU CCA ACU UCU UGG UCU U
PSA	1	GGU AGA AGA UGA CAG AUU A
	2	CAC CUG UUA UGU CUA CAU A
TOP	1	CAG CAA GGU UGG CAU GGA U
Tpn	1	GCA CCU GGG UAA GGG ACA U
	2	CCU CGA CCC UGA GCU CUA U
TPPII	1	GUG GCG AUG UGA AUA CUG C

2.1.5 PCR Primer

Die in der vorliegenden Arbeit zur RT-PCR verwendeten Primer der Firma BioTeZ GmbH (Berlin-Buch), im Maßstab 0,01µmol synthetisiert, entsalzen und als Lyophilisat bereitgestellt, sind in **Tab.2.3** aufgelistet. Die Primer wurden als 50µM Stammlösung in aqua dest aufbewahrt und 10µM in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Tab.2.3: Sequenzen (5' – 3') der Primerpaare verwendet zur RT-PCR.

Primer target	forward	reverse
AP-B	CTTCTCGCACTATGGCCAGG	CCGAAACCAGATCTCCGATG
BH	GGACAAGGTTGAACGCTGTT	ACACCACTCGGAATATCTCC
ERAPI	CCACTCCTTCATGGTGTCAG	GCAACAGTCACAGATTTAC
ERAPII	CTGCTTAACAGCCATCTTGC	CATCACCTAACTTGGCTTGG
GAPDH	CCGTCAAGGCTGAGAACGGG	GCCATGCCAGTGAGCTTCCC
LAP	GTGCCACAGTTCACAAGTGC	CCAGAAGCAAACAGGACTCC
POP	ATCCCAAGTATAGTTGCCAC	TAGCGGCCATCATCAGATAA
pp65	GTGGTTACGAGTTCTTCGTC	TGGAAGAGGACCTGACGATG
pp65 14mer	CGCGGATCCATGGGCATCCTGGC	GGGGATATCTTAAACCGTAGCCA
	CCGCAAC	CCATGGG
PSA	CCGGAAACCATAACCCTGATG	AATAAGCAATGCAGTCTCCC
TOP	ACTTCCCCCTCCTGAAGAAA	GGAAGTACTCCTTGAGCAGG
TPPII	ATGCAGGTTACAACTGATGG	GGCCAGGATCGCTGTATTTC

2.1.6 Synthetische HCMV pp65 Peptide

Die folgenden Peptide wurden von der AG Dr. Henklein (Institut für Biochemie - Charité, Berlin) in einer Reinheit von >90% synthetisiert und bereitgestellt. Zur Produktion wurde eine Standard-Fmoc-Methode mit einem Applied Biosystems 433A automatisiertem Synthesizer (Norwalk, CT) genutzt. Die Peptide wurden für *in vitro* Verdauexperimente und den TAP-Translokationssssay verwendet.

Peptidlänge	Protein	Aminosäuresequenz
33mer	pp65 ₄₈₁₋₅₁₃	VFTWPPWQAGILAR NLVPMVATV QGQNLKYGEF
9mer (Epitop)	pp65 ₄₉₅₋₅₀₃	NLVPMVATV
10mer	pp65 ₄₉₄₋₅₀₃	R NLVPMVATV
11mer	pp65 ₄₉₃₋₅₀₃	AR NLVPMVATV
12mer	pp65 ₄₉₂₋₅₀₃	LAR NLVPMVATV
13mer	pp65 ₄₉₁₋₅₀₃	ILAR NLVPMVATV
14mer	pp65 ₄₉₀₋₅₀₃	GILAR NLVPMVATV
15mer	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	AGILAR NLVPMVATV

2.1.7 Chemikalien / Verbrauchsmaterialien / Geräte

Chemikalien

Allgemeine Chemikalien wurden in *pro analysi* Qualität von den Firmen AppliChem, J.T. Baker, VWR international (Merck), Roth, Serva, Sigma-Aldrich geordert.

Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien und sterile Plastikwaren wurden von den Firmen Greiner, VWR, Falcon, Sarstedt verwendet. Im Besonderen:

PRC Tube 0,2ml 8-strip + cap	VWR
CN-Br-aktivierte Sepharose™ 4B	GE Healthcare
ELISA 96-F-Platten (hohe Bindung)	Greiner
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Kryoröhrchen	Sarstedt
Mikrotiterplatten 96-F / schwarz	Greiner
Nitrocellulosemembran Optitran BA-S85	Whatman Schleicher&Schuell
Röntgenfilme Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak

Geräte

Brutschrank	Heraeus
FACSCalibur mit Programmsoftware CellQuest	Becton Dickinson
FPLC Äkta	Amersham
Kamerasystem G:BOX mit Programmsoftware GeneSnap	Syngene
Kryobox	Nalgene
Massenspektrometer TSQ 7000	ThermoFisher
Mikroskop Leitz DMRD	Leica
Minigelsystem	Biorad
PCR Thermocycler Mastercyclergradient	Eppendorf
Spectrofluorimeter Synergy HT mit Programmsoftware KC4	Bio Tek
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham
Sterilbank Steril GARD Hood classII typA/B3	the baker company.inc
Zentrifugen	
Avanti J-E	Beckman
Biofuge pico	Heraeus
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Centrifuge GS-6KR	Beckman
Ultrazentrifuge Ultra Pro80	Sorvall

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Zelllinien

HeLa Zellen, humane Zervixkarzinomzellen, wurden in ISCOVE Medium mit 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2mM L-Glutamin und 1x Penicillin/Streptomycin (ISCOVE Kulturmedium) kultiviert. HeLa^{A2+} Zellen exprimieren stabil das MHC Klasse I Molekül HLA-A*0201 und wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. P-M. Kloetzel etabliert. Diese HeLa^{A2+} Zelllinie wurde in ISCOVE Kulturmedium unter Zusatz von 2µg/ml Puromycin kultiviert. Der pp65 exprimierende Zellklon HeLa^{A2+/pp65} wurde durch Ca-P-Transfektion der HeLa^{A2+} Zellen mit pcDNA-pp65.35 und dem Hygromycinresistenzgen-kodierenden pLXSH-Plasmid etabliert. Der Zellklon HeLa^{A2+/iP} wurde durch Transfektion der HeLa^{A2+} Zellen mit den proteasomalen Immunountereinheiten (iP) und pLXSH generiert (etabliert in der AG Kloetzel). HeLa^{A2+/pp65} und HeLa^{A2+/iP} wurden in ISCOVE Kulturmedium unter Zugabe von 2µg/ml Puromycin und 300µg/ml Hygromycin kultiviert.

Der humane Hybridzellklon T2 (aus B- / T-Lymphoblasten 721.174xCEM.T2) (Salter *et al.*, 1985) wurde in RPMI1640 Medium mit 10% FCS (hitzeinaktiviert) und 1x Penicillin/Streptomycin kultiviert. Diese Zellen exprimieren HLA-A2 und sind TAP1/2 sowie LMP2 und LMP7 defizient (Salter und Cresswell, 1986). T2.27 Zellen wurden durch Transfektion von T2 mit den proteasomalen Immunountereinheiten LMP7 und LMP2 generiert (Kuckelkorn *et al.*, 1995) und unter Zugabe von 1mg/ml G418 kultiviert.

Die humanen Epstein-Barr-Virus transformierten B-Zellen (EBV-B Zellen) wurden in RPMI1640 Medium mit 10% FCS (hitzeinaktiviert) und 1x Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifische CTL Linie wurde von Prof. Dr. H. Bernhard (TU München) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in ISCOVE Medium mit 10% AB-Serum (hitzeinaktiviert), 2mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin und 12,5mM Hepes. Die CTL wurden nach dem *Rapid Expansion Protocol* (Ho *et al.*, 2006) expandiert. Dafür wurden 1*10⁵ CTL mit 5*10⁶ EBV-B Zellen und 2,5*10⁷ PBMC unter Zugabe von 50U/ml IL2, 2ng/ml IL15 und 30ng/ml Okt3-Ak in 25ml Kulturmedium kokultiviert. Zunächst wurden die PBMC über einen Biocoll Gradienten (Biochrom) aus frischen *buffy coats* präpariert und mit 13 Gray bestrahlt. EBV-B Zellen wurden aus der Kultur genommen, gewaschen und ebenfalls bestrahlt (33 Gray). Die CTL wurden aufgetaut, gewaschen, mit PBMC und EBV-B Zellen vereinigt und IL2, IL15 sowie Okt3-Ak hinzugegeben. Nach 4d Inkubation wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und in frischem Medium mit IL2 und IL15 resuspendiert. Nach weiteren 4d Inkubation wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium mit 2x konzentrierten Zytokinen ersetzt. Nach 12d wurden die proliferierenden CTL durch Kokultivierung mit HeLa^{A2+/pp65} sowie Peptid beladenen T2 Zellen auf Spezifität und Reaktivität getestet und positive CTL in FCS, 10%

DMSO eingefroren. Damit standen HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifische CTL für weitere Experimente zur Verfügung.

Kultivierung

Alle Zellen wurden in sterilen Kulturplatten bzw. -flaschen (Greiner) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte kultiviert. Die Zellen wurden abhängig von ihrer Generationszeit alle 2 bis 4 Tage passagiert. Zum Umsetzen von adhärent wachsenden Zellen wurde das Medium verworfen, die Zellen mit 1x PBS (10x PBS: 1,4M NaCl, 90mM Na₂HPO₄*2H₂O, 27mM KCl, 15mM KH₂PO₄; pH7.2; autoklaviert) gewaschen und mit 0,5ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) für 1-2min inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von 10ml 1x PBS gestoppt, die Zellen von der Platte gewaschen und für 5min bei 1.000rpm (Centrifuge GS-6KR) pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in gewünschter Dichte ausplattiert. Suspensionszellen wurden zentrifugiert, das Pellet mit 1x PBS gewaschen und dann in frischem Medium ausgesät oder direkt in frischem Medium verdünnt umgesetzt.

Das Auszählen der Zellen erfolgte nach Anfärben mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Zellzahl*10⁴/ml).

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beschrieben pelletiert und in Kryomedium (Kulturmedium mit 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert. 1ml Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, dieses in eine vorgekühlte Kryobox platziert und nach Inkubation ü.N. bei -80°C, um eine gleichmäßige Abkühlung (-1°C/min) zu garantieren, in Flüssigstickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die angetaute Zellsuspension wurde durch Pipettieren in 10ml Medium überführt und pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

2.2.1.2 Transfektion von Zellen

Calcium-Phosphat-Transfektion

Zur Untersuchung der zellulären Prozessierung des viralen Proteins pp65 wurden mittels Ca-P-Transfektion (Graham und van der Eb, 1973) stabil pp65 exprimierende HeLa^{A2+/pp65} Zellklone generiert. Dazu wurden 1*10⁶ HeLa^{A2+} Zellen ausgesät und ü.N. inkubiert. Zur Präzipitation wurden 500µl 2x HBS (50mM Hepes, 280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂HPO₄*2H₂O, 12mM Dextrose; pH7.05; steril filtriert) in ein Polypropylen Falconröhrchen (Greiner) vorgelegt und ein Gemisch aus 62µl 2M CaCl₂ mit 10µg pcDNA-pp65.35 und 2µg pLXSH in 440µl sterilem aqua dest unter langsamem Schwenken tropfenweise hinzugegeben. Nach 30min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat resuspendiert und auf die Zellen gegeben. Nach 5h Inkubation im Brutschrank wurde ein Glycerol Schock durchgeführt. Dafür

wurden die Zellen in PBS, 20% Glycerol für 3-5min inkubiert und mehrfach mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für weitere 24-48h in Kulturmedium. Zur Selektion der positiv transfizierten Zellen wurden die Zellen in unterschiedlicher Verdünnung ($5 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^4$ Zellen pro well) in 100µl/well auf 96well-U-Platten unter Zugabe der Antibiotika entsprechend den Kultivierungsbedingungen ausplattiert. Nach 7d Inkubation wurden 100µl/well frisches Medium mit Antibiotikazusatz hinzugegeben. Einzeln wachsende Zellklone wurden vermehrt, kryokonserviert und mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse auf die Expression von pp65 getestet.

Transfektion mit *Lipofectamine2000*

Für die transiente Transfektion von pcDNA wurde das Reagenz *Lipofectamine2000* (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dafür wurde Kulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika auf die Zellen (2ml/6well) gegeben. Es wurden 3µg pcDNA mit 5µl Transfektionsreagenz in OptiMEM Transfektionsmedium pro 6well eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 6-8h.

siRNA Transfektion

Für die transiente Transfektion von siRNA wurde das *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent* (Roche) nach Protokoll des Herstellers genutzt. Für die gezielte Inhibition der Expression von Proteinen wurden eine oder mehrere spezifische siRNA Duplexes bzw. zur Kontrolle eine unspezifische siRNA verwendet. Die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 100-200nM eingesetzt. siRNA und Transfektionsreagenz wurden in OptiMEM Transfektionsmedium verdünnt auf die Zellen gegeben, die nach 1-3d Inkubation in weitere Experimente eingesetzt und auf erfolgreichen *knockdown* analysiert wurden. Die Inkubationszeiten wurden an die Durchführung der verschiedenen Versuche angepasst und von weiteren Behandlungen der Zellen mit pcDNA und/oder Inhibitor abhängig gemacht.

2.2.1.3 pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifische CTL Stimulation

Nach Transfektion mit siRNA und/oder pcDNA wurden die Zellen mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischen CTL in 96well-U-Platten kokultiviert. Dazu wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zielzellen mit $1-2 \cdot 10^4$ spezifischen T-Zellen in RPMI mit AB-Serum inkubiert und die Epitoppräsentation indirekt über die Freisetzung von IFN γ durch aktivierte CTL bestimmt. Hierfür wurden die Zielzellen geerntet und gezählt. Die benötigte Zellzahl wurde in 0,008% Glutaraldehyd für 3min auf Eis fixiert, gewaschen und für die Kokultivierung eingesetzt. Als Kontrolle dienten T2 Zellen, die mit bzw. ohne pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid beladen wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht (16h) im Brutschrank. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und IFN γ mittels „sandwich“-ELISA gemessen.

2.2.1.4 Durchflußzytometrie

Für den Nachweis der Oberflächenexpression des MHC Klasse I Moleküls HLA-A2 mit dem spezifischen Ak α HLA-A2-FITC wurden $5 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt. Die kultivierten Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und die gewünschte Zellzahl pro 96well auf eine Mikrotiterplatte übertragen. Nach einmal waschen mit FACS-Puffer (PBS, 1% BSA, 0,1% NaN_3) erfolgte die Färbung in 50 μl /well Ak-Verdünnung (1:100 in FACS-Puffer) für 20-30min im Dunkeln bei 4°C auf einem Schüttelinkubator. Anschließend wurden überschüssige Ak-Mengen durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt, die Zellen in 150 μl Puffer in FACS-Röhrchen überführt und im FACS-Gerät vermessen.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

Für die Proteinanalyse mittels SDS-PAGE wurden Zellpellets in RIPA-Puffer (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% Natriumdeoxycholat) mit 1x ProteaseinhibitorMix Complete™ aufgeschlossen, 15min auf Eis inkubiert und die Zellfragmente anschließend bei 14.000rpm für 15min abzentrifugiert (Centrifuge 5417R). Das Lysat wurde abgenommen und die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280nm ($A_{280\text{nm}}$) bestimmt. (Die Absorption $A_{280\text{nm}} = 1$ entspricht 1mg/ml Protein.) Äquivalente Proteinmengen wurden mit SDS-Probenpuffer (5x: 420mM Tris, 0,6M DTT, 30% Glycerol, 10% SDS, 0,1% Bromphenolblau) versetzt und nach 5min Denaturierung bei 95°C auf SDS-PA-Gele (**Tab.2.4**) aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

Tab.2.4: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelelen. Für vier 1,5mm Minigele. (4x Trenngelpuffer: 1,5M Tris pH8.8, 0,4% SDS; 4x Sammelgelpuffer: 0,5M Tris pH6.8, 0,4% SDS).

		Trenngel		Sammelgel
		8%	10%	4,5%
30% Acryl/Bisacrylamid 37,5:1 (AppliChem)	ml	10,7	13,3	3
4x Trenngelpuffer	ml	10	10	–
4x Sammelgelpuffer	ml	–	–	5
aqua dest	ml	19,3	16,7	12
TEMED	μl	100	100	60
10% APS	μl	100	100	60

Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laufpuffer: 25mM Tris, 200mM Glycin, 0,1% SDS) (Laemmli, 1970) bei maximal 120V durchgeführt. Anschließend wurden die nach

Masse getrennten Proteine aus dem Gel im semidry-Verfahren (25mM Tris, 200mM Glycin, 25% MeOH) 1h bei 400mA oder im Naß-Blot-Verfahren (25mM Tris, 200mM Glycin, 10% MeOH) 1h bei 70V auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die erfolgreiche Übertragung wurde durch Färbung der Membran mit PonceauS (1% PonceauS in 5% Essigsäure) geprüft. Zur weiteren Immundetektion der gewünschten Proteine wurde die Membran zunächst für 1h bei RT mit PBS, 5% Magermilchpulver, 0,4% Tween20 geblockt. Anschließend erfolgte ü.N. bei 4°C die Inkubation mit dem spezifischen primären Ak (in PBS, 2% Magermilchpulver, 0,1% Tween20). Nach dreimaligem Waschen für je 15min (PBS, 0,4% Tween20) wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten sekundären Ak für 1h bei RT inkubiert. Die Entwicklung der Membran erfolgte nach dreimaligem Waschen wie zuvor durch eine Chemolumineszenzreaktion mit ECL+ Substrat nach Anleitung des Herstellers. Zur Visualisierung der Signale wurde die Membran auf Röntgenfilm exponiert.

2.2.2.2 20S Proteasom Aufreinigung und *in vitro* Peptidverdau

20S Standardproteasomen (sP) wurden aus T2- bzw. Immunoproteasomen (iP) aus T2.27 Zellen isoliert und aufgereinigt, wie bereits zuvor beschrieben (Groettrup *et al.*, 1995). Dazu wurde das Zellpellet ($\geq 1 \cdot 10^9$) in Lysepuffer (TEAD-Puffer (200mM Tris pH7.2, 10mM EDTA, 10mM NaN₃, 1mM DTT) mit 50mM NaCl, 0,15% NP40) auf Eis resuspendiert und mit einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 30min bei 16.000rpm (Avanti J-E) und 4°C wurde das Lysat mit DEAE-Sephacel Gel (Pharmacia) für 1-2h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen mit 80mM NaCl-TEAD-Puffer entfernt und gebundenes Protein mit 500mM NaCl-TEAD-Puffer eluiert. Proteasom enthaltende Fraktionen wurden über Aktivitätsmessung mit fluorogenem Substrat Z-Gly-Gly-Leu-AMC (Bachem) und Proteinnachweis bestimmt und vereinigt. Im Folgenden wurden die Proteine mittels Ammoniumsulfat aus der Lösung gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50mM NaCl-TEAD-Puffer resuspendiert und auf einen 10-40%igen Saccharosegradienten aufgetragen. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 40.000rpm und 4°C für 16h (Ultrazentrifuge Ultra Pro80). Fraktionen mit Proteasom wurden erneut über Aktivitätsmessung und Proteinnachweis bestimmt und vereinigt. Des Weiteren erfolgte die Aufreinigung über FPLC (MonoQ HR5/5 Säule; Pharmacia) mit einem linearen Elutionsgradienten. Die Fraktionen wurden wiederum auf proteasomale Aktivität getestet und aktive Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse analysiert, entsprechend vereinigt und abschließend die Proteinkonzentration über A_{280nm} (Abschnitt 2.2.2.1) bestimmt. Somit stand aufgereinigtes 20S Proteasom für weitere Versuche bereit.

Zum *in vitro* Verdau wurden 8µg des Peptids mit 0,8µg aufgereinigtem 20S Proteasom in 50µl Verdauopuffer (20mM Hepes/KOH pH 7.8, 2mM MgAc₂, 2mM DTT) bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,5% TFA zum entsprechenden Zeitpunkt gestoppt. Die Proben wurden massenspektrometrisch analysiert.

2.2.2.3 Aufreinigung der Aminopeptidasen POP und AP-B und *in vitro* Peptidverdau

Zur Herstellung eines POP-Expressionsplasmids wurde die kodierende Sequenz von POP über die HindII/EcoRI - Schnittstellen in pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen) kloniert. Das humane C-terminal HIS-markierte POP wurde in *E.coli* BL21 exprimiert. Nach Ernte der Zellen wurden diese in Lysepuffer (50mM NaPO₄, 300mM NaCl, pH8) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung und Frier-Tau-Zyklen solubilisiert. Das Lysat wurde mit Ni-NTA Agarose (Qiagen) inkubiert, ungebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt und das gebundene HIS-markierte Protein mit Imidazol eluiert. Nach Auftrennung mittels FPLC (MonoQ HR5/5 Säule; Pharmacia) mit einem linearen Elutionsgradienten wurden die Fraktionen über Größenausschluß-Gelfiltration (Superdex 200) gereinigt. Mittels Aktivitätsmessung mit fluorogenem Substrat Z-Gly-Pro-AMC sowie SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurden die POP enthaltenden Fraktionen bestimmt.

Rekombinante HIS-markierte AP-B der Ratte (Pham *et al.*, 2007) wurde von Th. Foulon (Pierre und Marie Curie-Universität, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Zum *in vitro* Verdau wurden 20µg Peptid mit 5ng POP in 40µl Verdaupuffer (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT) bzw. 50ng AP-B in 40µl Verdaupuffer ohne DTT bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5% TFA zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt und die Proben massenspektrometrisch analysiert.

Die Klonierung von POP wurde von Ingrid Krenz, Expression und Aufreinigung von Dr. B. Reimann (Institut für Biochemie - Charité, Berlin) durchgeführt.

2.2.2.4 Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten

Für die Bestimmung der Aktivität der Aminopeptidasen AP-B und POP in Zelllysaten wurden fluorogene Substrate verwendet. Zellpellets wurden in Puffer (50mM Tris pH7.5, 50mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,1% TritonX) durch 3 Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen, 15min bei 14.000rpm zentrifugiert und anschließend wurden nach Proteinbestimmung wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.2.2.1) 5µg Lysat pro Reaktion eingesetzt. Die Aktivität der AP-B wurde in 50mM Tris pH7.4, 150mM NaCl mit 50µM H-Arg-AMC Substrat und POP Aktivität in 50mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 1mM DTT mit 50µM Z-Gly-Pro-AMC Substrat bestimmt. Die Inkubation erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten in 100µl Gesamtvolumen bei 37°C. Die Fluoreszenz wurde bei 360nm Extinktion und 460nm Emission in Zeitintervallen von 30min bestimmt.

2.2.2.5 TAP-Peptid-Translokationsassay

Für die Bestimmung der Peptidtranslokation durch TAP wurden aus B-LCL Zellen präparierte Mikrosomen (Roelse *et al.*, 1994) verwendet. Die Translokationseffizienz des Testpeptids wurde über die Konkurrenz um den Transport mit dem Fluorescein (FL) -markierten Referenzpeptid C(FL)VNKTERAY (Neisig *et al.*, 1995) bestimmt, welches eine Konsensussequenz für N-Glycosylierung im ER besitzt. Die konkurrierenden Testpeptide wurden in unterschiedlicher Konzentration mit 0,5µM Referenzpeptid und den Mikrosomen in Transportpuffer (5mM Hepes pH7.3, 130mM KCl, 10mM NaCl, 1mM CaCl₂, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂) unter Zugabe von 10mM ATP für 10min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskaltem Transportpuffer mit 10mM EDTA gestoppt. Die Proben wurden gewaschen und in Lysepuffer (50mM Tris pH7.5, 500mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% TritonX-100) resuspendiert. Nach 30min rotieren bei 4°C wurden Zelldebris für 10min bei 13.000rpm abzentrifugiert und das glykosylierte FL-markierte Referenzpeptid durch Inkubation mit Con-A Sepharose 4B (GE Healthcare) für 2h bei 4°C wiedergewonnen. Die Sepharose wurde dreimal mit Lysepuffer gewaschen und das Referenzpeptid mit 200µl Elutionspuffer (50mM Tris pH8, 500mM Mannopyranose, 10mM EDTA) durch 1h Schütteln bei RT eluiert. Die Fluoreszenz wurde bei 485nm Extinktion und 535nm Emission gemessen. Zur Kontrolle wurde die maximale Fluoreszenz in Proben ohne Testpeptid und die minimale in Proben ohne ATP mit 0,5M EDTA bestimmt.

Der TAP-Peptid-Translokationsassay wurde von Dr. F. Ossendorp (Universität Leiden, Niederlande) durchgeführt.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 IFN γ Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Für den ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurden 96well-F-Platten mit dem spezifischen primären Ak (1-D1K; 2µg/ml; 100µl/well; in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Der ungebundene Anteil wurde durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween20) entfernt. Dieser Waschschritt erfolgte nach jeder weiteren Anwendung. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Platte in Blockpuffer (PBS, 1% BSA) für 1h bei RT abgesättigt. Die Standardkonzentrationsreihe aus rekombinant hergestellten humanen IFN γ und die Proben (50µl/well) wurden in die Platte aufgetragen und für 1-2h bei RT inkubiert. Nach Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Ak (7-B6-1; 1µg/ml; 100µl/well; in Waschpuffer) für 1h bei RT erfolgte die Zugabe von Streptavidin-konjugierter HRP (1:1.000; 100µl/well; in Waschpuffer). Im Anschluß der einstündigen Inkubation bei RT wurde das Substrat Tetramethylbenzidine (TMB) (100µl/well) zugegeben, welches in ein farbiges Produkt während der 30minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT umgewandelt wird.

Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1M H₃PO₄ (50µl/well) gestoppt. Die Platte wurde photometrisch bei 450nm im Spectrofluorimeter vermessen. Die Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgte über die IFN γ Standardkurve.

2.2.3.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) stellt eine Methode dar, mit der über spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion ein gesuchtes Protein gezielt aus einem Gemisch isoliert und dabei unter geeigneten Bedingungen Interaktionspartner dieses Proteins identifiziert werden können (koIP).

Koppeln der *beads*

Es wurden die spezifischen Ak α ERAPI, α ERAPII und α Tapasin an CN-Br-aktivierte Sepharose-*beads* gekoppelt. Als Kontrolle diente ein unspezifischer Maus-Ak (MCP21, α Proteasom). Die kovalente Kopplung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurden 150mg Pulver in 1mM HCl zunächst für 15min zum Quellen inkubiert und danach dreimal gewaschen. Die gequollenen *beads* wurden mit 10mg Protein (nach A_{280nm}) in *coupling buffer* (0,1M NaHCO₃ pH8.3, 0,5M NaCl) für 1-2h bei RT langsam rotierend inkubiert. Ungebundene CN-Br Liganden wurden durch zweistündige Inkubation mit 0,1M Tris pH8 bei RT abgesättigt. Abschließend wurden die mit Ak-gekoppelten *beads* in 3 Zyklen mit Puffern mit wechselndem pH (0,1M Tris pH8, 0,5M NaCl; 0,1M NaAcetat pH4, 0,5M NaCl) gewaschen. Die Ak-*beads* wurden als 20%ige Suspension in 20% Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

Präparation der Lysate

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellpellets in 200-300µl Lysepuffer (33mM Hepes pH7.3, 150mM KAc, 4mM MgAc₂, 10% Glycerol, 1% DBC (Calbiochem)) ergänzt mit 1x ProteaseinhibitorMix CompleteTM und 5mM NEM schonend aufgeschlossen und für 30min bei 4°C langsam rotierend inkubiert. Anschließend wurden Zellfragmente für 15min bei 14.000rpm abzentrifugiert. Das Lysat wurde abgenommen und die Proteinkonzentration über A_{280nm} (Abschnitt 2.2.2.1) bestimmt. Es wurde 0,5 bzw. 1mg Protein pro IP eingesetzt.

IP mit Antikörper-gekoppelten *beads*

Für eine IP wurden pro Ansatz 50 bzw. 100µl der 20%igen *bead*-Suspension eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen der *beads* mit 500µl Waschpuffer (33mM Hepes pH7.3, 150mM KAc, 4mM MgAc₂, 10% Glycerol, 0,2% DBC) wurden diese mit Lysat in einem Gesamtvolumen von 500µl für 4h bei 4°C langsam rotierend inkubiert. Anschließend wurden die *beads* für 1min bei 10.000rpm abzentrifugiert und von den Überständen ein Aliquot für weitere Analysen abgenommen. Danach wurden die *beads* dreimal mit je 500µl Waschpuffer gewaschen, wobei der zweite Waschschrift mit erhöhtem Salzgehalt (+200mM NaCl) erfolgte, um unspezifisch gebundenes Protein effektiver zu entfernen.

Elution

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in 35 bzw. 45 µl 1x SDS-Probenpuffer (5x: 420mM Tris, 0,6M DTT, 30% Glycerol, 10% SDS, 0,1% Bromphenolblau) für 20min bei RT auf einem Schüttelinkubator. Die *beads* wurden für 2min bei 10.000rpm abzentrifugiert und das Eluat abgenommen. Alle Proben sowie Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse analysiert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Semiquantitative RT-PCR

Die RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ist eine Methode, mit der RNA durch reverse Transcriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und in der anschließenden Polymerasereaktion spezifisch amplifiziert werden kann. Zur Überprüfung des spezifischen siRNA-vermittelten *knockdown* wurde die RNA aus Zellen isoliert. Dafür wurde *RNAeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers genutzt. Der RNA-Gehalt wurde durch Messung der Absorption bei 260nm (A_{260nm}) unter Anwendung folgender Formel $c (\mu g/ml) = 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot A_{260nm}$ bestimmt. Für die cDNA Synthese aus 1 µg RNA wurde *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) mit poly-dT Primern und reverser Transcriptase nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die spezifische PCR wurde in einem 25 µl Ansatz mit 1-6 µl cDNA und Hifi-Polymerase (*FastStart High Fidelity PCR System*; Roche) in einem Thermocycler durchgeführt. Das PCR-Programm startete mit einmalig 5min 95°C Denaturierung gefolgt von 30 Zyklen zur Amplifikation. Jeder PCR-Zyklus bestand aus 1min 95°C Denaturierung, 1,5min 55°C Hybridisierung und 1min 72°C Synthese. Abschließend wurden die Proben 10min bei 72°C zur Termination der Reaktion inkubiert und dann bei 4°C gekühlt. Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer (6x: 60mM EDTA, 60% Glycerol, 0,2% OrangeG, 0,05% Xylenecyanol) versetzt, auf einem Ethidiumbromid gefärbten 1,5-3%igen Agarosegel (in TAE-/ Lauf-Puffer: 40mM Tris/Essigsäure pH7.8, 1mM EDTA) bei 60V elektrophoretisch getrennt und unter UV-Licht visualisiert. Als Größenstandard wurde der 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Dokumentation erfolgte mittels des Kamerasystems G:BOX (Syngene).

2.2.4.2 Klonierung des 14mer Minigenkonstrukts

Zur weiteren Untersuchung der zellulären Prozessierung des proteasomalen 14mer Vorläuferpeptids wurde dieses als Minigenkonstrukt generiert. Aufgrund der geringen Größe des entsprechenden Oligonukleotidfragments wurde es direkt über die Anlagerung eines komplementären Primerpaares hergestellt. Dazu wurden zwei Primer kreiert, die neben der kodierenden Sequenz sowohl ein Start- und Stopp-Signal als auch die Überhänge der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI (5' G[▼]GA

TCC 3') und XbaI (5' T[▼]CT AGA 3') aufweisen (**Abb.2.1**). Je 10µg der synthetischen Primer 14merBamHI for und 14merXbaI rev wurden zur Dimerisierung in *Annealing* Puffer (30mM Hepes/KOH pH7.4, 100mM KAc, 2mM MgAc₂) für 5min bei 95°C inkubiert und anschließend im anfangs 65°C warmen Wasserbad unter ständigem Rühren auf RT abgekühlt. Zur Phosphorylierung der Enden des generierten doppelsträngigen Nukleotidfragments wurde dieses mit T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK) unter Zugabe von 10mM ATP für 30min bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Kinase erfolgte für 10min bei 70°C.

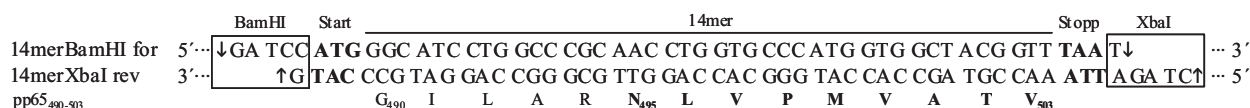


Abb.2.1: Oligonukleotidsequenzen der 14mer Primer mit Angabe der Restriktionsschnittstellen und der resultierenden Peptidsequenz.

Der Zielvektor pcDNA3.1zeo+ (5µg) wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI ü.N. bei 37°C nach Angaben des Herstellers geschnitten und anschließend mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Die Vektor-pcDNA wurde durch Zugabe von 1/10Vol 3M NaAc, 2,5Vol Ethanol für 15min auf Eis gefällt, anschließend für 15min bei 14.000rpm abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in aqua dest resuspendiert und die Reinheit der linearisierten Vektor-pcDNA im Agarosegel überprüft. Die Ligation von Vektor und 14mer Insert erfolgte im Verhältnis 1:3 mit der T4 DNA Ligase ü.N. bei 15°C. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation von *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) durch Hitzeschock verwendet. Die transformierten Zellen wurden ü.N. auf LB_{Amp} Agarplatten (LB Agar: 1,5% Bacto-Agar, 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 17,1mM NaCl; autoklaviert; 100µg/ml Ampicillin frisch zugesetzt) bei 37°C inkubiert. Zur Analyse positiver Klone wurden einzeln gewachsene Kolonien gepickt, in 5ml LB_{Amp} Medium Flüssigkulturen (LB Medium: 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 17,1mM NaCl; autoklaviert; 100µg/ml Ampicillin frisch zugesetzt) überführt, ü.N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert und aus 2ml Bakterienkultur die Plasmid-DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) nach Vorschrift isoliert. Die übrige Kultur wurde bei 4°C aufbewahrt. Die präparierte pcDNA-pp65-14mer Plasmid-DNA wurde von Agowa GmbH (Berlin) sequenziert. Der positiv analysierte Klon wurde in einer 200ml LB_{Amp} Medium Flüssigkultur vermehrt und die Plasmidisolation mit dem *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Der DNA-Gehalt wurde durch Messung der Absorption bei 260nm (A_{260nm}) bestimmt und über $c (\mu g/ml) = 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot A_{260nm}$ berechnet.

2.2.5 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse von *in vitro* Verdauprodukten ermöglichten deren Identifizierung und Quantifizierung.

Die Proben wurden zunächst über reverse-Phase HPLC (μ RPC C2/C18 2.1/10 Säule, Amersham) chromatographisch getrennt. Dazu wurden diese mit dem internen Standard 9GPS (YPHFMPNLTGPS) zur Kontrolle der Meßbedingungen versetzt und mittels Autosampler (Agilent) in das HPLC System HP11000 injiziert. Die Elution erfolgte über einen Gradienten 25-95% B in 35min, der Substratspezifisch optimiert wurde. Als Laufmittel wurden A 0,05% TFA und B 70% Acetonitril, 0,045% TFA verwendet.

Die eluierten Fragmente wurden direkt der online-gekoppelten Detektion durch Elektrospray Ionisierung-Massenspektrometrie (ESI-MS) (LCQ; ThermoFisher) zugeführt. Die Analyse erfolgte im Massenbereich 200-2.000Da. Hierbei konnten die Fragmente über das Masse/Ladungsverhältnis m/z und anschließender Fragmentierung in der Ionenfalle identifiziert werden. Dabei wurde mittels der Auswertesoftware BioWorks ein Vergleich von theoretisch errechneten und den praktisch gemessenen MS/MS-Spektren erstellt. Bei der Analyse der entstandenen Fragmente konnte aus der Ladungsstufe die molekulare Masse berechnet und die dazugehörige Sequenz mit Hilfe des Programms SEQUEST (version2.0) ermittelt werden. Aus diesen Daten resultierend wurden Schnittkarten erstellt.

Eine Quantifizierung der generierten Verdauprodukte konnte mittels der Software LCQuan durchgeführt werden und erfolgte entweder im Vergleich zu synthetischen Peptiden oder über die Kombination der ermittelten Parameter m/z der MS und Retentionszeit in der Chromatographie. Hierbei stellte die Integration des detektierten Signals ein Maß für die relative Menge des entsprechenden Verdauprodukts dar. Über die graphische Darstellung der relativen Intensität gegen die Zeit konnte eine entsprechende Kinetik erstellt werden.

Zur Auswertung der massenspektrometrischen Daten und Spektren wurden des Weiteren die Programme Xcalibur, Paws, Extraktor-B5 angewendet. Die Darstellung erfolgte mittels EXCEL (Microsoft).

Die massenspektrometrischen Messungen und z.T. Auswertungen wurden von Kathrin Textoris-Taube (Institut für Biochemie - Charité, Berlin) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus (HCMV) ist weltweit verbreitet und verläuft meist asymptomatisch, stellt jedoch für immunsuppressive Patienten eine ernsthafte Komplikation dar und unterstreicht damit die Bedeutung einer gezielten Behandlung. Für eine erste antivirale Immunreaktion ist das Protein pp65 von entscheidender Rolle. Dieses Phosphoprotein von 65kDa (pp65) ist eine Strukturkomponente des Virion Teguments und wird bei Infektion einer Zelle ins Zytoplasma freigesetzt, prozessiert und über MHC Klasse I präsentiert – unabhängig von viraler Genexpression (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Damit stellen pp65 spezifische CD8⁺ zytotoxische T Lymphozyten (CTL) eine potentiell wichtige Immunabwehr für eine frühe Kontrolle und Limitierung der HCMV Infektion dar. Bisher war jedoch unbekannt, wie das virale pp65 Protein in der Zelle prozessiert und einer effektiven Immunabwehr zugänglich wird.

3.1 Proteasomale Prozessierung von pp65

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche zellulären Vorgänge während der Prozessierung von pp65 stattfinden. Es war von besonderem Interesse, die in die Generierung des immundominanten HLA-A2-restringierten pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops NLVPMVATV (Kern *et al.*, 1998) involvierten Proteasen bzw. Aminopeptidasen zu identifizieren.

In einer Untersuchung bezüglich viraler Evasionsmechanismen wurde in HCMV-infizierten Fibroblasten demonstriert, dass das pp65 Protein proteasomal prozessiert werden kann (Besold *et al.*, 2007). Das Proteasom ist für die Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase verantwortlich und durch Generierung antigener Peptide in die Immunantwort involviert. Um die proteasomale Degradation von pp65 im zellulären System zu überprüfen, wurden zunächst HeLa^{A2+} Zellen transient mit dem Plasmid pcDNA-pp65 transfiziert und zusätzlich mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin 1µM für 1h inkubiert. Epoxomicin ist ein spezifischer Inhibitor des Proteasoms, der an die β2 und β5 Untereinheit sowohl im Standard- als auch Immunoproteasom kovalent bindet und dadurch die katalytische Aktivität irreversibel hemmt (Meng *et al.*, 1999). Für die Analyse des Einflusses vom Immunoproteasom wurden parallel HeLa^{A2+/iP} Zellen verwendet, die neben HLA-A2 auch die proteasomalen Immunountereinheiten konstitutiv exprimieren. Zur Detektion der Epitopräsentation wurden pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifische CTL eingesetzt. Die Stimulation der spezifischen CTL wurde über die Menge des sezernierten IFNγ im ELISA quantifiziert.

Die Expression von pp65 führte in beiden verwendeten Zelllinien zu einer effizienten Präsentation des pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops, welche durch die IFNγ Sekretion der aktivierten CTL nachgewiesen wurde (Abb.3.1a.A). Dabei konnte gegenüber HeLa^{A2+/iP} Zellen, die das Immunoproteasom exprimieren, im Vergleich zu HeLa^{A2+} Zellen eine deutlich stärkere CTL Reaktion aufgrund einer erhöhten

Epitopräsentation detektiert werden. Die spezifische Reaktion der CTL wurde durch die hinreichende Proteasominhibition mittels Epoxomicin nahezu vollständig unterbunden, wodurch eine Proteasom-abhängige Degradation des pp65 Proteins demonstriert werden konnte. Zudem ist gezeigt, dass die Inhibition des Proteasoms zur Akkumulation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen führt (Schubert *et al.*, 2000). Zum Nachweis der effektiven Proteasomhemmung wurden daher Zelllysate der mit und ohne Epoxomicin behandelten Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf ihre Expression von Ubiquitinkonjugaten analysiert (**Abb.3.1a.B**). In Zelllysaten der Epoxomicin-behandelten Zellen wurden in Übereinstimmung mit der Proteasominhibition deutlich mehr Ubiquitinkonjugate detektiert. Somit konnte die proteasomale Prozessierung von pp65 in der Zelle bestätigt werden.

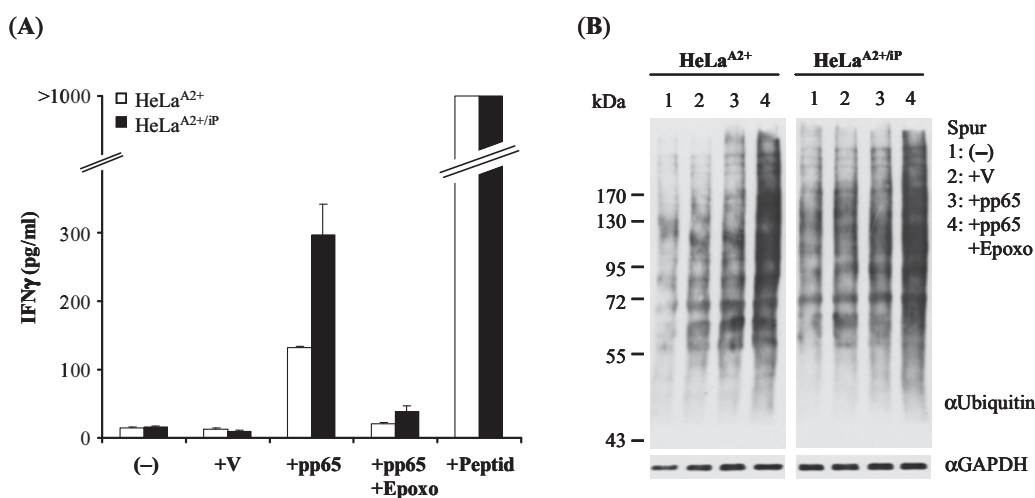


Abb.3.1a: Stimulation pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL mit pp65 transfizierten Zellen. pp65 wurde Proteasom-abhängig prozessiert. **(A)** HeLa^{A2+} Zellen (exprimieren HLA-A2) (□) und HeLa^{A2+/iP} Zellen (exprimieren HLA-A2 und proteasomale Immununtereinheiten) (■) wurden transient mit pcDNA-pp65 transfiziert (+pp65), als Kontrolle unbehandelt belassen oder mit Epoxomicin (1 μ M 1h) (+Epoxo) inkubiert und anschließend mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischen CTL kokultiviert. Die Auswertung der Epitopräsentation erfolgte indirekt über die Quantifizierung des freigesetzten IFN γ mittels ELISA. Unbehandelte (-) bzw. mit Vektor (+V) transfizierte Zellen dienten als interne Expressionskontrollen. **(B)** Proteasominhibition durch Epoxomicin führte zur Akkumulation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen. 25 μ g Zelllysate der mit und ohne Epoxomicin behandelten Zellen wurden mittels 10%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). (Der Assay wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung eines von zwei repräsentativen Experimenten.)

Über die genaue proteasomale Prozessierung von pp65, die eine wesentliche Voraussetzung für die Generierung von MHC/Peptid Komplexen darstellt, ist bisher wenig bekannt. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf mittels *in vitro* Verdauexperimenten untersucht werden, welche Peptidfragmente durch das Proteasom entstehen. Es ist weitreichend beschrieben, dass das Proteasom hauptsächlich den korrekten C-Terminus von MHC Klasse I Epitopen, aber zumeist N-terminal verlängerte Epitopvorläuferpeptide generiert. Deshalb ist das Abspalten von N-terminalen Aminosäuren, sogenanntes Trimmen, durch Aminopeptidasen zur Generierung von Epitopen korrekter Länge notwendig (Kloetzel, 2001; Goldberg *et al.*, 2002; Kloetzel und Ossendorp, 2004). Dahingehend wurde untersucht, ob

Vorläuferpeptide, die als Substrate für Amino-peptidasen fungieren könnten, als proteasomale Verdauungsprodukte identifiziert werden können.

Dafür wurden Standardproteasom- (sP) aus T2- und Immunoproteasom- (iP) Komplexe aus T2.27 Zellen isoliert (Abschnitt 2.2.2.2). T2 Zellen sind für die proteasomalen Immununtereinheiten LMP2 ($\beta 1$) und LMP7 ($\beta 5$) defizient. T2.27 Zellen wurden durch die Transfektion von T2 Zellen mit den fehlenden Immununtereinheiten generiert. Ein 33 Aminosäuren (As) langes Peptid (33mer), welches das Epitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ N- und C-terminal verlängert enthält, wurde synthetisiert und zusammen mit aufgereinigtem 20S Proteasom für den *in vitro* Verdau verwendet. Die generierten Peptidfragmente wurden mittels massenspektrometrischer Analysen untersucht.

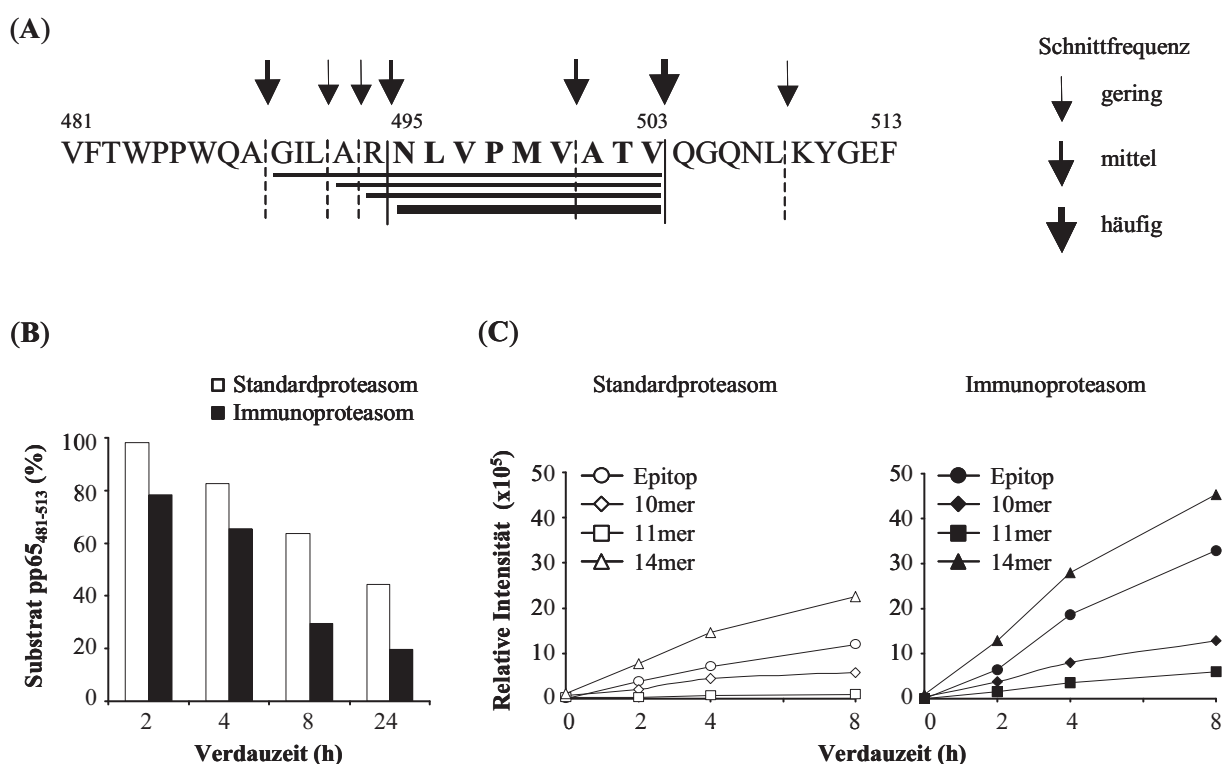


Abb.3.1b: *In vitro* Verdau des HCMV pp65₄₈₁₋₅₁₃ 33mer Peptids mit aufgereinigtem 20S Proteasom. Es wurden neben dem Epitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ drei N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide (14mer [G-V], 11mer [A-V], 10mer [R-V]) generiert. (A) Die Aminosäuresequenz des 33mer Polypeptids wurde im Ein-Buchstaben-Code angegeben und das HLA-A2-restringierte CD8⁺ T Zellepitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ hervorgehoben. Die proteasomalen Schnittstellen und die identifizierten Fragmente wurden durch vertikale Linien und horizontale Balken angezeigt. Die Intensität der Schnitte wurde proportional zur Dicke der Pfeile dargestellt. (B) Darstellung der massenspektrometrischen Analysen des prozentualen Substratabbaus durch Standard- (□) und Immunoproteasom (■). 20S Standardproteasom wurde aus T2- bzw. Immunoproteasom aus T2.27 Zellen isoliert. Das pp65₄₈₁₋₅₁₃ 33mer Peptid (8 µg) wurde mit aufgereinigtem 20S Proteasom (0,8 µg) für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C inkubiert und die Substratdegradation mittels Massenspektrometrie analysiert. (C) Kinetische Analysen der Produktgenerierung durch Standard- (links) und Immunoproteasom (rechts) – massenspektrometrisch ermittelte relative Intensitäten der Schnittfragmente wurden abgebildet. (Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen wurde dargestellt.)

In **Abb.3.1b.A** ist die Aminosäuresequenz des 33mer Peptids dargestellt. Durch Pfeile sind die proteasomal generierten Schnitte sowie deren Schnitthäufigkeit gekennzeichnet. Der dominanteste Schnitt wird nach dem C-terminalen V₅₀₃ des Epitops gesetzt, wodurch der korrekte C-Terminus gebildet wird.

Zudem entstehen zwei markante Schnitte: der Schnitt nach R₄₉₄ erzeugt den richtigen N-Terminus, wohingegen durch den Schnitt nach A₄₈₉ ein N-terminal verlängertes Epitop entsteht. Darüber hinaus kommt es durch einen Schnitt nach V₅₀₀ zur Zerstörung des Epitops. Weitere Schnitte mit geringer Frequenz liegen N- und C-terminal vom Epitop. Ein Vergleich des Substratabbaus beider Proteasomentypen macht deutlich, dass sich die Schnittspezifität von Standard- und Immunoproteasom bezüglich des pp65 33mer Peptids nicht unterscheidet, dass jedoch das iP mit einer erhöhten Effizienz das Polypeptid degradiert (**Abb.3.1b.B**). Durch das iP sind bereits zwischen 4 und 8h Inkubation 50% der eingesetzten Substratmenge umgesetzt, wohingegen das sP deutlich länger als 8h benötigt. Dies wurde auch in der Darstellung der relativen Intensitäten der generierten Produkte deutlich (**Abb.3.1b.C**). Hierbei erzeugt das iP im gleichen Zeitraum ungefähr die zweifache Menge an Produkten. Neben dem 9mer Epitop konnten drei N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide identifiziert werden, wobei das Epitop und das 14mer Vorläuferpeptid [G₄₉₀-V₅₀₃] am häufigsten generiert werden, was den nachgewiesenen Schnittpräferenzen entspricht. Die 10 und 11mer Peptide werden nur in geringem Maße produziert. Damit stellt sich im Folgenden die Frage, inwieweit Aminopeptidasen für postproteasomales Trimmen der identifizierten Vorläuferpeptide von Relevanz sind.

3.2 Peptidtranslokation über den TAP Transporter in das ER

Trimmprozesse können sowohl im Zytosol als auch im ER stattfinden. In beiden Kompartimenten wurden Peptidasen identifiziert, die an der Generierung bestimmter Epitope zur MHC Klasse I Präsentation beteiligt sind. Bezüglich der einzelnen proteasomal generierten pp65 Peptide sollte in den folgenden Versuchen differenziert werden, welche primäre Lokalisation die an der weiteren Prozessierung beteiligten Aminopeptidasen einnehmen.

Zunächst wurden TAP Translokationsstudien durchgeführt, um zu prüfen, ob und welche der proteasomal generierten pp65 Peptide das ER erreichen können. Der TAP Transporter greift aufgrund seiner Sequenzspezifität sowie Längendetermination selektiv in die Auswahl der im ER vorkommenden MHC Klasse I Liganden ein. Peptide von 8 bis 16As Länge werden präferentiell von TAP gebunden (Cresswell *et al.*, 1994; van Endert *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995). Dabei sind die drei N-terminalen Aminosäuren sowie der C-Terminus entscheidend. Hydrophobe oder basische Aminosäuren werden C-terminal bevorzugt, N-terminales Prolin hingegen wirkt negativ auf die Transporteffizienz (Uebel *et al.*, 1997; Uebel und Tampe, 1999; Bhasin und Raghava, 2004).

In diesen Versuchen wurde neben dem pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop auch die Translokation der N-terminal verlängerten 10 bis 15mer pp65 Peptide durch TAP getestet. Der Fokus lag dabei auf den proteasomal generierten 10, 11 und 14mer Vorläuferpeptiden. Die zu testenden Peptide weisen Valin als hydrophobe Aminosäure am C-Terminus auf, enthalten die Sequenz des 9mer Epitops und unterscheiden sich durch N-terminal zunehmende Länge. Nach Inkubation der Peptide zusammen mit einem fluoreszierenden

Referenzpeptid und Mikrosomen aus B-LCL Zellen wurde analysiert, in welchem Maße das jeweilige Testpeptid in der Lage war, mit dem Referenzpeptid um die TAP Bindung zu konkurrieren und damit die Fluoreszenz zu mindern. Es konnte gezeigt werden, dass über TAP das Epitop sowie die kurzen 10 und 11mer Peptide in das ER gelangen (**Abb.3.2A**), wohingegen das 12mer und längere Peptide kaum bzw. nicht durch TAP transportiert werden und daher das ER wahrscheinlich nicht erreichen (**Abb.3.2B**). Die Sequenz des Epitops weist die präferierten Aminosäuren in den entsprechenden Positionen auf, aufgrund dessen das Epitop erwartungsgemäß effizient durch TAP transloziert wird. Das 10mer hingegen kompetiert schlechter mit dem Referenzpeptid um die TAP Bindung als das 11mer. Die scheinbar bessere TAP Bindung des 11mer Peptids könnte mit dem relativ großen basischen Argininrest an Position 2 zusammenhängen, welcher durch TAP in dieser Position bevorzugt wird, direkt am N-Terminus des 10mer Peptids jedoch störend wirkt.

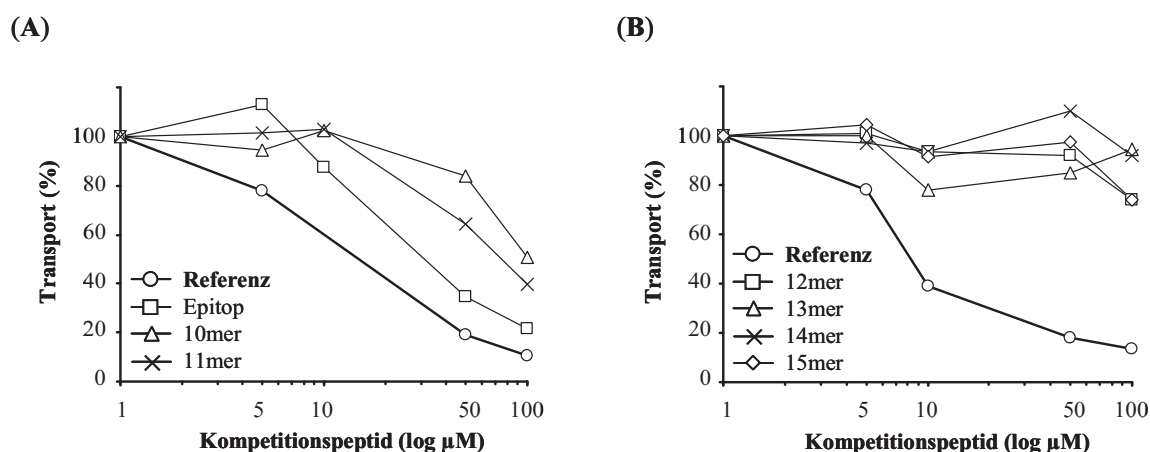


Abb.3.2: pp65 Peptide kompetierten mit unterschiedlicher Effizienz um TAP-abhängige Translokation. pp65 9 bis 15mer Peptide wurden auf ihre Fähigkeit getestet, mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Referenzpeptid um den Transport durch TAP zu konkurrieren. Dafür wurden die konkurrierenden Testpeptide in unterschiedlicher Konzentration mit dem Referenzpeptid und Mikrosomen von B-LCL Zellen unter Zugabe von ATP für bestimmte Zeit inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion die Fluoreszenz bestimmt. Die gemessene Fluoreszenz des transportierten Referenzpeptids in Anwesenheit des Kompetitionspeptids wurde als prozentualer Transport dargestellt. (A) pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop sowie 10 und 11mer Peptide wurden effizient transportiert. (B) pp65 12 bis 15mer Peptide wurden kaum bzw. nicht durch TAP transportiert.

Für die pp65 Präsentation bedeutet dies, dass das primär proteasomal gebildete 14mer Peptid durch zytosolische Amino-peptidasen prozessiert werden muß, um als getrimmtes Peptid über TAP ins ER zu gelangen oder aber im Zytosol degradiert wird und damit nicht mehr für die Präsentation bereit steht. Vornehmlich gelangt wahrscheinlich das Epitop selbst durch TAP ins ER und kann durch Präsentation auf MHC Klasse I Molekülen der Immunabwehr zugänglich werden. Die 10 und 11mer Peptide scheinen aufgrund der geringeren proteasomalen Produktion und des weniger effizienten Transports durch TAP für die finale Epitoppäsentation eine nur untergeordnete Rolle zu spielen. Dennoch können diese ins ER gelangen und stellen damit Substrate für ER Amino-peptidasen dar. Daher bleibt es zu prüfen, ob ER

Aminopeptidasen einen Einfluß auf die pp65 Epitopräsentation ausüben. Somit können postproteasomale Trimmprozesse der pp65 Peptide sowohl im Zytosol als auch im ER stattfinden.

3.3 Etablierung stabil pp65 exprimierender HeLa^{A2+/pp65} Zellen

Für weiterführende Analysen der zellulären Prozessierung von pp65 wurde zunächst der Zellklon HeLa^{A2+/pp65} etabliert, der das pp65 Protein in voller Länge stabil exprimiert. Als Ursprungszellen dienten dafür HeLa^{A2+} Zellen, die bereits das MHC Klasse I Allel HLA-A2 exprimieren. Mittels Ca-P-Transfektion wurden diese Zellen zusätzlich mit den Plasmiden pcDNA-pp65 und pLXSH kotransfiziert und über Hygromycinresistenz selektiert (Abschnitt 2.2.1.2). Die generierten Klone wurden durch Western Blot Analyse auf pp65 Expression getestet (Abb.3.3A) und mittels Durchflußzytometrie auf ihre HLA-A2 Expression überprüft (Abb.3.3B), um eine effiziente Epitopräsentation zu gewährleisten. Die generierten HeLa^{A2+/pp65} Zellen exprimieren das virale pp65 Protein und zeigen eine hohe HLA-A2 Zelloberflächenexpression. Die Analysen der drei unabhängig generierten pp65 Klone ergaben vergleichbare Resultate. Somit stellen die HeLa^{A2+/pp65} Zellen ein geeignetes System dar, um die zelluläre Prozessierung des pp65 Proteins progressiv zu untersuchen. Im Folgenden sollte der Einfluß von Aminopeptidasen auf die proteasomal generierten Peptide bezüglich der pp65 Epitopräsentation analysiert werden.

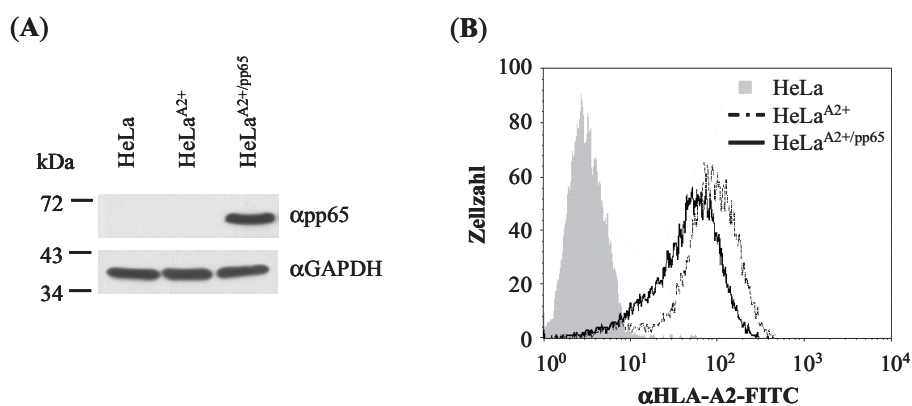


Abb.3.3: Etablierung stabil pp65 exprimierender HeLa^{A2+/pp65} Zellen. HeLa^{A2+} Zellen (HeLa Zellen, die das MHC Klasse I Molekül HLA-A2 exprimieren) wurden zusätzlich mit pcDNA-pp65 und pLXSH stabil kotransfiziert und über Hygromycinresistenz auf pp65-Expression selektiert. (A) Überprüfen der pp65 Expression nach Transfektion mittels Western Blot Analyse. 100µg Zelllysate wurden mittels 10%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischem pp65 Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). Als Kontrolle wurden unbehandelte HeLa Zellen verwendet. (B) Durchflußzytometrische Analysen zur Bestimmung der HLA-A2 Zelloberflächenexpression. Die Darstellung im Histogramm-Blot zeigte deutlich die Verschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten der HLA-A2⁺ Zellen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit einem FITC-gekoppelten α HLA-A2 Ak (1:100). Als Kontrolle wurden HLA-A2⁻ HeLa Zellen (grau ausgefüllt) verwendet.

3.4 siRNA *knockdown* von zytosolischen Aminopeptidasen führt zu einer erhöhten Epitoppräsentation

Aminopeptidasen beeinflussen die Antigenpräsentation durch ihre Trimmaktivität, wobei die Balance zwischen der Generierung korrekter Epitope und der Degradation antigener Peptide entscheidend ist. Basierend auf bisherigen Erkenntnissen wurde zunächst der Einfluß der im Zusammenhang mit der MHC Klasse I Prozessierung bereits charakterisierten zytosolischen Aminopeptidasen auf die Epitoppräsentation von pp65 untersucht.

Um zu ermitteln, welchen möglichen Beitrag die Aminopeptidasen BH, LAP, PSA, TPPII und TOP zur Prozessierung von pp65 leisten, wurden HeLa^{A2+/pp65} Zellen mit entsprechenden siRNA gegen die jeweilige Aminopeptidase behandelt und anschließend mit Epitop-spezifischen CTL über Nacht (ü.N.) kokultiviert. Der Effekt der inhibierten Expression der betrachteten Aminopeptidase wurde über die veränderte Epitoppräsentation anhand der von aktivierten CTL sekretierten IFN γ Konzentration ermittelt. Als Folge des effizienten siRNA *knockdown*, verifiziert über RT-PCR Analysen (**Abb.3.4A.2**), wurde für LAP und TPPII jeweils eine verstärkte CTL Antwort durch erhöhte IFN γ Freisetzung nachgewiesen (**Abb.3.4A.1**). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese beiden Aminopeptidasen im Zytosol pp65 Peptide abbauen und damit zur verminderten Epitoppräsentation führen können. Im Gegensatz dazu blieb jedoch die inhibierte Expression der Aminopeptidasen BH, PSA oder TOP im Vergleich zur verwendeten Kontroll-siRNA nahezu ohne Effekt auf die Epitoppräsentation von pp65 (**Abb.3.4A.1**).

Erste Hinweise auf weitere an der Epitopgenerierung beteiligte Aminopeptidasen ergaben massenspektrometrische Analysen zytosolischer Fraktionen verschiedener Zelllinien bezüglich ihrer Proteasezusammensetzung. Dabei konnte unter anderem die AP-B identifiziert werden, welche vorrangig C-terminal von Arginin- und Lysinresten schneidet und damit zum N-terminalen Trimmen der identifizierten proteasomal generierten pp65 Vorläuferpeptide beitragen könnte. Als weitere zytosolische Aminopeptidase, die bislang nicht im konkreten Zusammenhang mit der Antigenprozessierung beschrieben worden ist, wurde POP in die Untersuchungen mit eingeschlossen, welche nach Prolinen spaltet und somit einen Schnitt innerhalb des Epitops verursachen könnte. Der Effekt dieser Aminopeptidasen auf die pp65 Epitoppräsentation wurde in den folgenden Experimenten ebenfalls durch spezifischen siRNA *knockdown* in HeLa^{A2+/pp65} Zellen analysiert, dessen Effizienz auf RNA-Ebene durch RT-PCR verifiziert wurde (**Abb.3.4B.2**). Interessanterweise konnte aufgrund der spezifisch inhibierten Enzymexpression sowohl für POP als auch für AP-B eine erhöhte Epitoppräsentation durch eine verstärkte CTL Reaktion detektiert werden (**Abb.3.4B.1**). Damit konnte nur für POP die angenommene destruktive Wirkung nachgewiesen werden, da AP-B aufgrund der bekannten Schnittpräferenz einen positiven Effekt auf die Epitopgenerierung haben sollte. Es zeigte sich jedoch, dass beide Aminopeptidasen zu einer verminderten Epitoppräsentation führen.

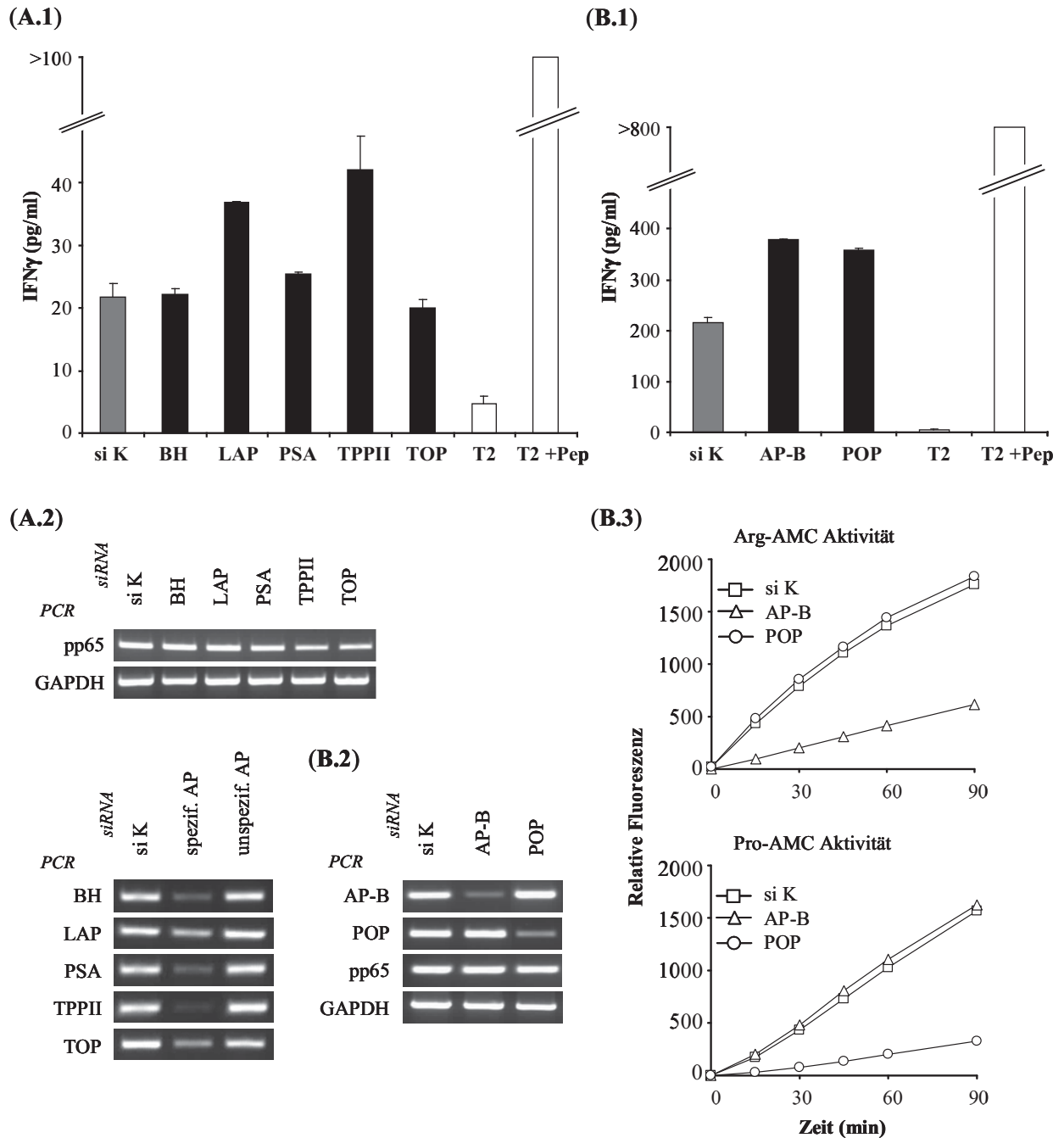


Abb.3.4: Stimulation pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL mit HeLa^{A2+/pp65} Zellen nach siRNA knockdown von zytosolischen Aminopeptidasen. Die Inhibition der Expression von LAP, TPPII, AP-B oder POP führte zu einer erhöhten CTL Antwort. **(A.1)** und **(B.1)** HeLa^{A2+/pp65} Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen die angegebenen Aminopeptidasen bzw. mit Kontroll-siRNA (si K) für 72h inkubiert und anschließend mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischen CTL kokultiviert. Die Auswertung der Epitopräsentation erfolgte indirekt über die Quantifizierung des freigesetzten IFN γ mittels ELISA. T2 Zellen mit (+Pep) und ohne pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptidbeladung dienten zur Kontrolle der CTL Spezifität. (In vier unabhängigen Experimenten wurden von jedem Ansatz Doppelbestimmungen durchgeführt.) **(A.2)** und **(B.2)** Überprüfen des siRNA knockdown mittels RT-PCR. Total RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen Primern amplifiziert. GAPDH- und pp65-Expression dienten als Kontrollen der PCR-Reaktion. **(B.3)** Nachweis der inhibierten Peptidaseexpression durch Bestimmung der Aktivität von AP-B und POP in Zelllysaten nach siRNA knockdown mit fluorogenen Substraten. Zur Bestimmung der AP-B Aktivität (oben) wurde H-Arg-AMC Peptid und für POP (unten) Z-Gly-Pro-AMC Peptid verwendet. Es wurden 50 μ M Substrat mit 5 μ g Zelllysate inkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten die Fluoreszenz gemessen. (Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen wurde dargestellt.)

Um die reduzierte Expression der Aminopeptidasen POP und AP-B aufgrund von siRNA Transfektion zu bestätigen, wurden in Zelllysaten der siRNA-behandelten und unbehandelten Zellen die Aktivitäten dieser Aminopeptidasen mit fluorogenen Substraten getestet. Dazu wurde für die AP-B Aktivität das Substrat H-Arg-AMC und für die POP Aktivität Z-Gly-Pro-AMC verwendet, welche durch C-terminalen Schnitt nach Arginin bzw. Prolin die fluoreszierende AMC-Gruppe freisetzen. Nach Inkubation des Substrats mit Zelllysate wurde die Fluoreszenz in bestimmten Zeitintervallen photometrisch gemessen und die Substrataktivitäten in **Abb.3.4B.3** graphisch dargestellt. Für die jeweils spezifische Aktivität wurde eine Reduktion nachgewiesen, was eine durch siRNA inhibierte Expression dieser Aminopeptidase bestätigt. Im Vergleich zur Kontrolle (si K) ist die Umsetzung des Arg-AMC Substrats in den Lysaten der mit AP-B siRNA-behandelten Zellen (AP-B) um ca. 65% vermindert. Durch POP siRNA wurde diese Aktivität nicht beeinträchtigt. Ebenso wurde die Peptidaseaktivität für Pro-AMC durch siRNA gegen POP auf ca. 20% vermindert, wobei die Kontrolle (si K) und AP-B vergleichbare Werte aufwiesen. Da die Aktivität nicht vollständig gehemmt werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Substrate auch durch andere Peptidasen umgesetzt werden können oder aber funktionelles Restprotein der jeweiligen Aminopeptidase weiterhin vorhanden ist, wie es durch die RT-PCR Analysen angedeutet wird. Somit konnte gezeigt werden, dass der effiziente *knockdown* der zytosolischen Aminopeptidasen TPPII, LAP, AP-B und POP mit einer verbesserten Epitopräsentation einhergeht und diese Peptidasen daher an der Zerstörung von pp65 Peptiden im Zytosol beteiligt sind.

3.5 AP-B und POP schneiden vorwiegend im pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop

In den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass AP-B ein unkonventionelles Schnittverhalten aufweist und mit verstärkter Frequenz zusätzlich Schnitte innerhalb des pp65 Epitops generiert, da sich die Peptidaseaktivität negativ auf die Epitopräsentation auswirkt. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wurden *in vitro* Verdauexperimente mit rekombinant generierten Enzymen und synthetischem Peptid durchgeführt. Der proteolytische Verdau des synthetischen Peptids mit POP diente aufgrund der vorhersehbaren Resultate als Vergleich. Die Aminopeptidase POP wurde dafür in *E.coli* Zellen exprimiert und schrittweise aus dem Zelllysate aufgereinigt. Zur Kontrolle der Reinheit der Probe wurden nach der Gelfiltration entsprechende Fraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert (**Abb.3.5a.A**). In der Peakfraktion wurden dabei neben einer prominenten Bande in der für das rekombinante POP zu erwartenden Größe von ca. 80kDa leichte Proteinverunreinigungen detektiert. Der spezifische Nachweis von POP wurde mittels Western Blot Analyse der Peakfraktion erbracht (**Abb.3.5a.B**). Zudem wies aufgereinigtes POP keine weitere Proteaseaktivität auf und wurde somit für weiterführende Experimente verwendet.

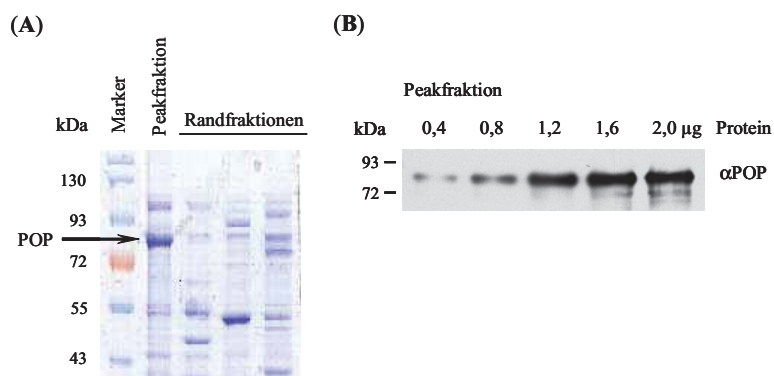


Abb.3.5a: Aufreinigung der Aminopeptidase POP. Analyse von rekombinant hergestellter POP in ausgewählten Fraktionen der Gelfiltration. (A) 5 μ l je Fraktion (\times 500 μ l) wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend die Proteine mit Coomassie angefärbt. Es zeigte sich in der Peakfraktion eine prominente Bande in der erwarteten Größe von ca. 80kDa, welche dem rekombinanten POP zugeordnet wurde. (B) Verschiedene Proteinmengen aus dieser Peakfraktion wurden mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischem Ak α POP inkubiert.

Da gegenwärtig kein rekombinantes Protein der humanen AP-B zur Verfügung steht, wurde rekombinante AP-B der Ratte (Pham *et al.*, 2007), freundlicherweise von Th. Foulon (Pierre und Marie Curie Universität Paris, Frankreich) bereit gestellt, genutzt. Die AP-B der Ratte weist eine 90%ige Sequenzhomologie zur humanen AP-B auf und zeigt zudem vergleichbare enzymatische Aktivität bezüglich der Schnittpräferenz (Piesse *et al.*, 2002).

Für den *in vitro* Verdau wurde das vom Proteasom generierte pp65 14mer Vorläuferpeptid GILARNLVPMVATV synthetisch hergestellt. Das synthetische Peptid wurde mit aufgereinigten Aminopeptidasen inkubiert und die generierten Peptidfragmente mittels massenspektrometrischer Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten identifiziert. Die kinetische Analyse der Substratdegradation durch POP und AP-B zeigte, dass beide Aminopeptidasen das dargebotene Substrat effizient umsetzen können, wobei POP insgesamt eine höhere Aktivität aufweist (**Abb.3.5b.A**). Die weitere Auswertung der massenspektrometrischen Daten machte deutlich, dass AP-B durch N-terminales Trimmen des 14mer Peptids nach R₄₉₄ das Epitop generiert, zusätzlich jedoch zwei sehr dominante Schnitte im Epitop C-terminal von N₄₉₅ und M₄₉₉ induziert. Darüber hinaus wurde eine geringe Schnittfrequenz nach A₅₀₁ beobachtet (**Abb.3.5b.B**). Basierend auf diesen Ergebnissen könnte der negative Effekt von AP-B auf die pp65 Präsentation durch die bevorzugten Schnitte innerhalb des Epitops erklärt werden. Besonders deutlich wird die destruktive Aktivität von AP-B gegenüber der Epitopgenerierung in der zeitabhängigen Darstellung der relativen Intensitäten der mit einer Epitopzerstörung einhergehenden generierten Schnittfragmente (**Abb.3.5b.C**). Die Bildung des Fragments [G₄₉₀-M₄₉₉] konnte mit einer sehr hohen Intensität detektiert werden. Des Weiteren wird dominierend über die Epitopgenerierung das Fragment [G₄₉₀-N₄₉₅] gebildet. Das Epitop selbst wird in geringem Umfang generiert, so dass es für eine effiziente Präsentation wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung ist.

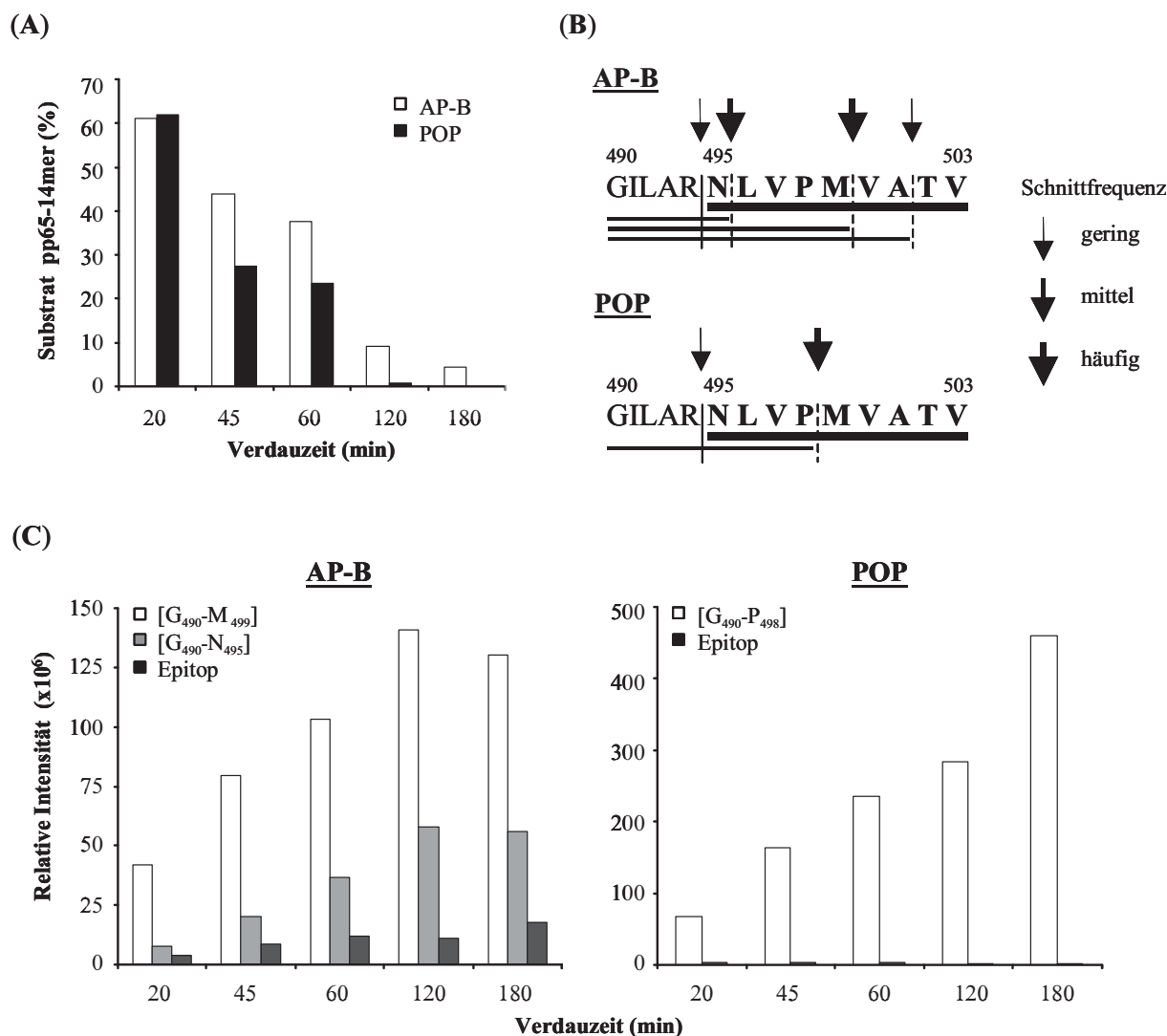


Abb.3.5b: *In vitro* Verdau des HCMV pp65₄₉₀₋₅₀₃ 14mer Peptids mit rekombinanten Aminopeptidasen AP-B und POP. 20µg Peptid wurden mit 5ng POP bzw. 50ng AP-B inkubiert, die Reaktion zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von TFA gestoppt und die Verdauprodukte massenspektrometrisch analysiert. **(A)** Darstellung der massenspektrometrischen Analysen des prozentualen Substratabbaus durch AP-B (□) und POP (■). **(B)** Die Aminosäuresequenz des 14mer Peptids wurde im Ein-Buchstaben-Code angegeben und das HLA-A2-restringierte CD8⁺ T Zellepitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ hervorgehoben. Die Schnittstellen und die identifizierten Fragmente wurden durch vertikale Linien und horizontale Balken angezeigt. Die Intensität der Schnitte entspricht der Dicke der Pfeile. **(C)** Kinetische Analysen der Produktgenerierung durch AP-B (links) und POP (rechts) – massenspektrometrisch ermittelte relative Intensitäten der Schnittfragmente wurden dargestellt. Im Vergleich zum Epitop wurden von AP-B und POP vorrangig die Fragmente [G₄₉₀-M₄₉₉], [G₄₉₀-N₄₉₅] bzw. [G₄₉₀-P₄₉₈] durch Schnitte innerhalb des Epitops generiert. (Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen wurde abgebildet.)

Die Analysen des *in vitro* Peptidverdaus mit POP bestätigten die im zellulären System erhaltenen Resultate. Durch die Prozessierung des 14mer Peptids C-terminal vom Prolinrest führte POP erwartungsgemäß zur Epitopzerstörung (**Abb.3.5b.B**). Zudem konnte ein Schnitt mit sehr geringer Frequenz N-terminal vom Epitop identifiziert werden. Aber auch hier wird durch die Darstellung der relativen Intensitäten der Verdauprodukte deutlich (**Abb.3.5b.C**), dass diese äußerst marginale Epitopgenerierung wahrscheinlich ohne Auswirkungen auf eine effiziente CTL Stimulation ist. Es zeigte

sich, dass das Fragment [G₄₉₀-P₄₉₈], das durch den dominanten Schnitt nach Prolin innerhalb des Epitops entsteht, in überwiegendem Maße gebildet wird.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die vorangegangenen Beobachtungen der *knockdown* Experimente und zeigen, dass das pp65 14mer Peptid sowohl durch POP als auch AP-B effizient prozessiert werden kann und dabei das eigentliche Epitop für die MHC Klasse I Präsentation zerstört wird. Im Besonderen zeigt AP-B dabei ein verändertes Schnittverhalten mit unerwarteten Präferenzen. Diese Resultate erklären vornehmlich, warum der *knockdown* von POP und AP-B zu einer verstärkten Aktivierung von spezifischen CTL führte (**Abb.3.4B.1**), da wahrscheinlich in gleicher Weise die anderen proteasomal gebildeten pp65 Peptide durch POP und AP-B degradiert werden können.

3.6 HeLa^{A2+} Transfektion mit 14mer Minigenkonstrukt

Die bisherigen Resultate machen deutlich, dass zytosolische Aminopeptidasen nachhaltig modulierend auf die pp65 Präsentation wirken. Im Folgenden sollten daher die erhaltenen *in vitro* Befunde bezüglich der Degradation des 14mer Peptids durch Aminopeptidasen im zellulären System überprüft werden. Dafür wurde die entsprechende DNA-Sequenz kodierend für das 14mer Peptid in einen Expressionsvektor inseriert und in HeLa^{A2+} Zellen transient zur Expression gebracht. Um proteasomale Einflüsse ausschließen zu können, wurden die Zellen parallel zur Transfektion mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin behandelt. Zur Analyse wurden siRNA gegen die bisher betrachteten Aminopeptidasen und pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifische CTL zur Detektion der Epitoppräsentation analog zu den vorherigen Versuchen verwendet.

Die erfolgreiche Transfektion des 14mer Minigenkonstrukts sowie die Funktionalität der jeweiligen siRNA wurde durch RT-PCR Analysen nachgewiesen (**Abb.3.6C**). Zur Kontrolle der effizienten Expression des 14mer Peptids diente der Vergleich zu den Expressionskontrollen der mit leerem Vektor (+V) transfizierten bzw. unbehandelten (–) HeLa^{A2+} Zellen, der eine differentiellen CTL Reaktion demonstrierte (**Abb.3.6B**). Darüber hinaus wurde die Effizienz der Proteasominhibition durch Epoxomicin in Zelllysaten mittels Western Blot Analysen durch die Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten überprüft. In Zelllysaten der Epoxomicin-behandelten Zellen wurden dabei in Übereinstimmung mit der Proteasominhibition deutlich mehr Ubiquitinkonjugate detektiert (**Abb.3.6D**).

Die Aktivierung der CTL wurde wiederum über das sezernierte IFN γ in den Mediumüberständen mittels ELISA bestimmt. In **Abb.3.6A** sind die ermittelten IFN γ Konzentrationen für die jeweilige inhibierte Aminopeptidase im Vergleich zur Kontroll-siRNA dargestellt. Durch den *knockdown* der zytosolischen Aminopeptidasen TOP, PSA oder BH konnte erneut kein signifikanter Effekt auf die CTL Stimulation nachgewiesen werden, so dass diese Peptidasen höchstwahrscheinlich keine Rolle, weder generierend noch zerstörend, in der pp65 Epitopprozessierung spielen.

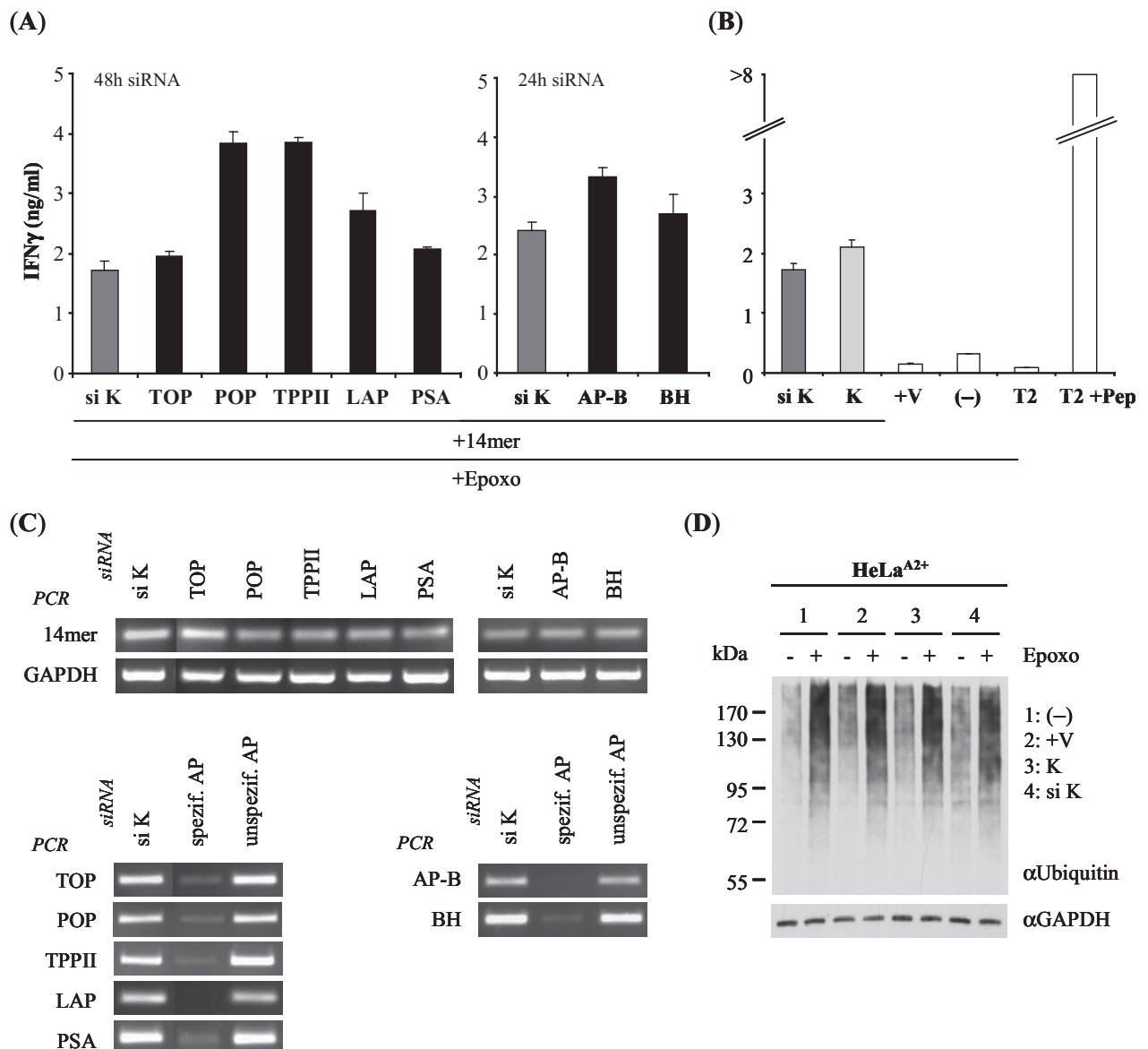


Abb.3.6: Stimulation pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL mit pp65 14mer-Minigen transfizierten HeLa^{A2+} Zellen nach siRNA *knockdown* von zytosolischen Aminopeptidasen. Die inhibierte Expression der Aminopeptidasen TPPII oder POP führte zu einer deutlich erhöhten CTL Antwort, für LAP bzw. AP-B war tendenziell eine verstärkte Epitopräsentation zu beobachten. **(A)** HeLa^{A2+} Zellen wurden mit spezifischen siRNA gegen die angegebenen Aminopeptidasen bzw. mit Kontroll-siRNA (si K) für 24h bzw. 48h inkubiert, mittels *Lipofectamine2000* mit pcDNA-pp65-14mer transient transfiziert (+14mer), parallel mit Epoxomicin (1 μ M) (+Epoxo) behandelt und anschließend mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischen CTL kokultiviert. Die Auswertung der Epitopräsentation erfolgte indirekt über die Quantifizierung des freigesetzten IFN γ mittels ELISA. **(B)** HeLa^{A2+} Zellen unbeladung (-) und mit Vektor (+V) transfiziert dienten als interne Expressionskontrollen. T2 Zellen mit (+Pep) und ohne pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptidbeladung dienten zur Kontrolle der CTL Spezifität. **(C)** Überprüfen des siRNA *knockdown* mittels RT-PCR. Total RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen Primern amplifiziert. GAPDH- und 14mer-Expression dienten als Kontrollen der PCR-Reaktion. **(D)** Proteasominhibition durch Epoxomicin führte zur Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten. 25 μ g Zellysat der mit (+) und ohne (-) Epoxomicin behandelten Zellen wurden mittels 10%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). (Der Assay wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung eines von drei repräsentativen Experimenten.)

Dahingegen führte eine verringerte Expression der Aminopeptidasen TPPII oder POP wiederholt zu einer deutlich verstärkten CTL Antwort. Für LAP oder AP-B wurden ebenfalls tendenziell erhöhte IFN γ Werte als Zeichen einer gesteigerten CTL Aktivierung detektiert. In Abwesenheit dieser Aminopeptidasen im zellulären System kommt es demzufolge zu einer verbesserten Präsentation des pp65 Epitops. Dies spricht für einen negativen Einfluß dieser Aminopeptidasen bei der pp65 Epitopgenerierung.

Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente, die mit dem stabil transfizierten Zellklon HeLa^{A2+/pp65} durchgeführt wurden. In beiden Versuchssystemen wurde für die Aminopeptidasen TPPII, LAP, POP und AP-B ein destruktiver Effekt auf die pp65 Epitoppräsentation detektiert, eine konstruktiv wirkende Aminopeptidase konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher kann geschlussfolgert werden, dass im Zytosol ein vorrangig destruktives Milieu für pp65 antigene Peptide herrscht. Da das pp65 14mer Peptid dennoch zur Epitoppräsentation führt, obwohl es offenbar nicht über TAP ins ER transportiert wird, besteht die Möglichkeit, dass höchstwahrscheinlich eine weitere zytosolische Aminopeptidase, die hier nicht analysiert wurde, in Trimmprozesse von pp65 Peptiden involviert ist. Aufgrund der unerwarteten Beobachtung, dass es ohne Inhibition des Proteasoms zu einer drastisch erhöhten CTL Reaktion kommt (Daten nicht gezeigt), könnte andererseits das 14mer Peptid trotz seiner geringen Größe zum proteasomalen Substrat werden. Die detektierte Epitoppräsentation unter Epoxomicineinfluß wäre somit auf proteasomale Restaktivität zurückzuführen. Dieser Effekt könnte am ehesten durch die erhebliche Überexpression des Minigenkonstrukts *in vitro* verursacht werden.

3.7 siRNA *knockdown* von ER Aminopeptidasen führt zu einer verminderten CTL Stimulation

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Einfluß von zytosolischen Aminopeptidasen auf die pp65 Prozessierung untersucht, aber auch im ER (*Endoplasmatisches Reticulum*) ist Prozessieren von Vorläuferpeptiden durch ER-Peptidasen möglich und stellt damit eine weitere Möglichkeit zur Modulierung der Epitoppräsentation dar. ERAPI und ERAPII sind Aminopeptidasen im ER von humanen Zellen, denen eine essentielle Rolle in der MHC Klasse I Antigenpräsentation durch das Trimmen von Vorläuferpeptiden zugeschrieben wird. Sie zeigen aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten ergänzende Trimmaktivität und arbeiten, zum Teil im heterodimeren Komplex assoziiert, zusammen (Saveanu *et al.*, 2005).

In den Translokationsstudien wurde nachgewiesen, dass die pp65 10 und 11mer Vorläuferpeptide über TAP ins ER gelangen können und daher durch ER Aminopeptidasen prozessiert werden müssen. Gleichzeitig könnten diese Peptide bereits im Zytosol getrimmt worden sein und würden demzufolge als reifes Epitop transportiert, das keiner weiteren Prozessierung bedarf. Damit wären ERAPI und ERAPII ohne Einfluß auf die pp65 Epitoppräsentation.

Um zu prüfen, welche Bedeutung den ER Aminopeptidasen bei der Prozessierung der pp65 Vorläuferpeptide zukommt, wurden in den folgenden Versuchen analog zu den vorangegangenen *knockdown* Experimenten HeLa^{A2+/pp65} Zellen mit entsprechenden siRNA gegen die jeweilige Aminopeptidase sowohl einzeln als auch in Kombination behandelt und anschließend mit Epitop-spezifischen CTL ü.N. kokultiviert. Die Aktivierung der CTL wurde wiederum im ELISA über das in das Medium sezernierte IFN γ bestimmt.

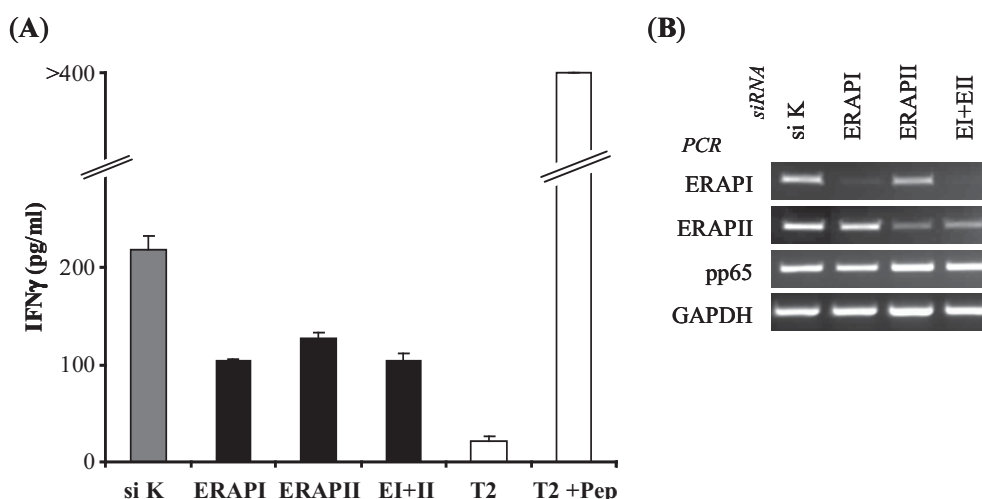


Abb.3.7: Stimulation pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL mit HeLa^{A2+/pp65} Zellen nach siRNA *knockdown* von ER Aminopeptidasen. Die inhibierte Expression der Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII einzeln und auch in Kombination (EI+II) führte zu einer reduzierten CTL Antwort. **(A)** HeLa^{A2+/pp65} Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen die angegebenen Aminopeptidasen bzw. mit Kontroll-siRNA (si K) für 72h inkubiert und anschließend mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischen CTL kokultiviert. Die Auswertung der Epitopräsentation erfolgte indirekt über die Quantifizierung des freigesetzten IFN γ mittels ELISA. T2 Zellen mit (+Pep) und ohne pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptidbeladung dienten zur Kontrolle der CTL Spezifität. **(B)** Überprüfen des siRNA *knockdown* mittels RT-PCR. Total RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen Primern amplifiziert. GAPDH- und pp65-Expression dienten als Kontrollen der PCR-Reaktion. (Der Assay wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung eines von vier repräsentativen Experimenten.)

Der effiziente *knockdown* der ER Aminopeptidasen, durch RT-PCR Analysen verifiziert (**Abb.3.7B**), resultiert aufgrund einer verminderten Epitopräsentation in einer reduzierten CTL Reaktion (**Abb.3.7A**). Im Vergleich zur siRNA-Kontrolle (si K) wurden um etwa 50% verminderte IFN γ Konzentrationen in den Kulturüberständen der mit spezifischer siRNA behandelten Zellen nachgewiesen, wobei kein additiver Effekt durch den gemeinsamen *knockdown* von ERAPI und ERAPII zu verzeichnen war. Zudem konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen ERAPI und ERAPII detektiert werden, obwohl ERAPII die Schnittspezifität nach basischen Aminosäuren wie Arginin besitzt und daher gegenüber ERAPI vermehrt am Trimmen der pp65 Vorläuferpeptide beteiligt sein sollte. Dennoch könnten diese Beobachtungen auch im Zusammenhang mit einem weniger effizienten siRNA-Effekt oder einer höheren Stabilität des ERAPII Proteins stehen, so dass eine entsprechende Inhibition der ERAPI und ERAPII Aktivität zu dem erwarteten dominierenden Effekt von ERAPII führen könnte.

Basierend auf diesen Resultaten lässt sich ableiten, dass ERAPI und ERAPII im ER einen wesentlichen Beitrag zur pp65 Prozessierung leisten, so dass den 10 und 11mer Vorläuferpeptiden in diesem Zusammenhang wahrscheinlich eine vorrangige Bedeutung zufällt. Des Weiteren scheint das 9mer Epitop nicht durch ERAPI oder ERAPII abgebaut zu werden, da in diesem Fall kein produktiver Effekt der ER Aminopeptidasen zu erwarten wäre.

3.8 Einfluß IFN γ -induzierbarer Aminopeptidasen in Kooperation mit dem Immunoproteasom

Unter Infektionsbedingungen führen immunmodulatorische Zytokine, wie z.B. IFN γ , zu einer veränderten Proteinexpression, die unter anderem eine gesteigerte Antigenpräsentation induziert. Demnach wird eine entscheidende Rolle für IFN γ -induzierbare Aminopeptidasen in der Antigenprozessierung angenommen.

In den weiteren Experimenten wurde daher der Einfluß der IFN γ -induzierbaren Aminopeptidasen LAP, ERAPI und ERAPII in Kooperation mit dem Immunoproteasom auf die pp65 Epitopräsentation untersucht. Die bisherigen Ergebnisse demonstrierten, dass die zytosolische Aminopeptidase LAP einen antagonistischen Effekt auf die pp65 Präsentation ausübt, wohingegen für die ER Aminopeptidasen antagonistische Funktionen in der effizienten Epitopprozessierung nachgewiesen wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Immunoproteasom (iP) im Vergleich zum Standardproteasom (sP) das pp65 Substrat effizienter umsetzt und damit zu einer verstärkten CTL Antwort führt. In Vorversuchen wurde des Weiteren festgestellt, dass die Expression der proteasomalen Immununtereinheiten in den transfizierten Zelllinien HeLa^{A2+} und HeLa^{A2+/pp65} durch IFN γ nicht mehr in dem Maße induzierbar war wie in den ursprünglichen HeLa Zellen. Expressionsanalysen machten deutlich, dass die prozessierten Immununtereinheiten auf gleichbleibendem Niveau generiert werden (**Abb.3.8C**). Eine vermehrte, durch IFN γ induzierte Expression von i β 2 und i β 5 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, obgleich das MHC Klasse I Molekül HLA-A2 und das virale Protein pp65 ausreichend exprimiert wurden.

Um in den folgenden Experimenten den Einfluß des iP untersuchen zu können, wurden HeLa^{A2+/iP} Zellen verwendet, die neben HLA-A2 die proteasomalen Immununtereinheiten konstitutiv exprimieren. Entsprechend den vorangegangenen Versuchen wurden die Zellen mit siRNA gegen die jeweilige Aminopeptidase separat oder in Kombination behandelt, transient mit pcDNA-pp65 transfiziert und die Aktivierung der CTL im Anschluß an die Kokultivierung über das sezernierte IFN γ bestimmt.

Aufgrund der differentiellen CTL Reaktion konnte die effiziente pp65 Expression im Vergleich zu den Expressionskontrollen der mit leerem Vektor (+V) transfizierten bzw. unbehandelten (–) HeLa^{A2+/iP} Zellen gezeigt werden (**Abb.3.8A**). In Übereinstimmung mit den Resultaten der vorherigen Untersuchungen führte der effiziente *knockdown* der ER Aminopeptidasen (**Abb.3.8B**) zu einer verminderten Freisetzung von IFN γ durch die spezifischen CTL (**Abb.3.8A**). Die Reduktion der Epitopräsentation aufgrund von ERAPI siRNA Behandlung war jedoch im Vergleich zu den Versuchen

mit HeLa^{A2+/pp65} Zellen weniger stark ausgeprägt. Die ERAPII siRNA Behandlung führte gegenüber ERAPI zu einer deutlich geringeren CTL Reaktion, so dass ERAPII wahrscheinlich unter Einfluß des iP eine größere Rolle beim Trimmen von pp65 Vorläuferpeptiden im ER zukommt. Ein additiver Effekt bei gleichzeitiger Inhibition von ERAPI und ERAPII konnte abermals nicht nachgewiesen werden.

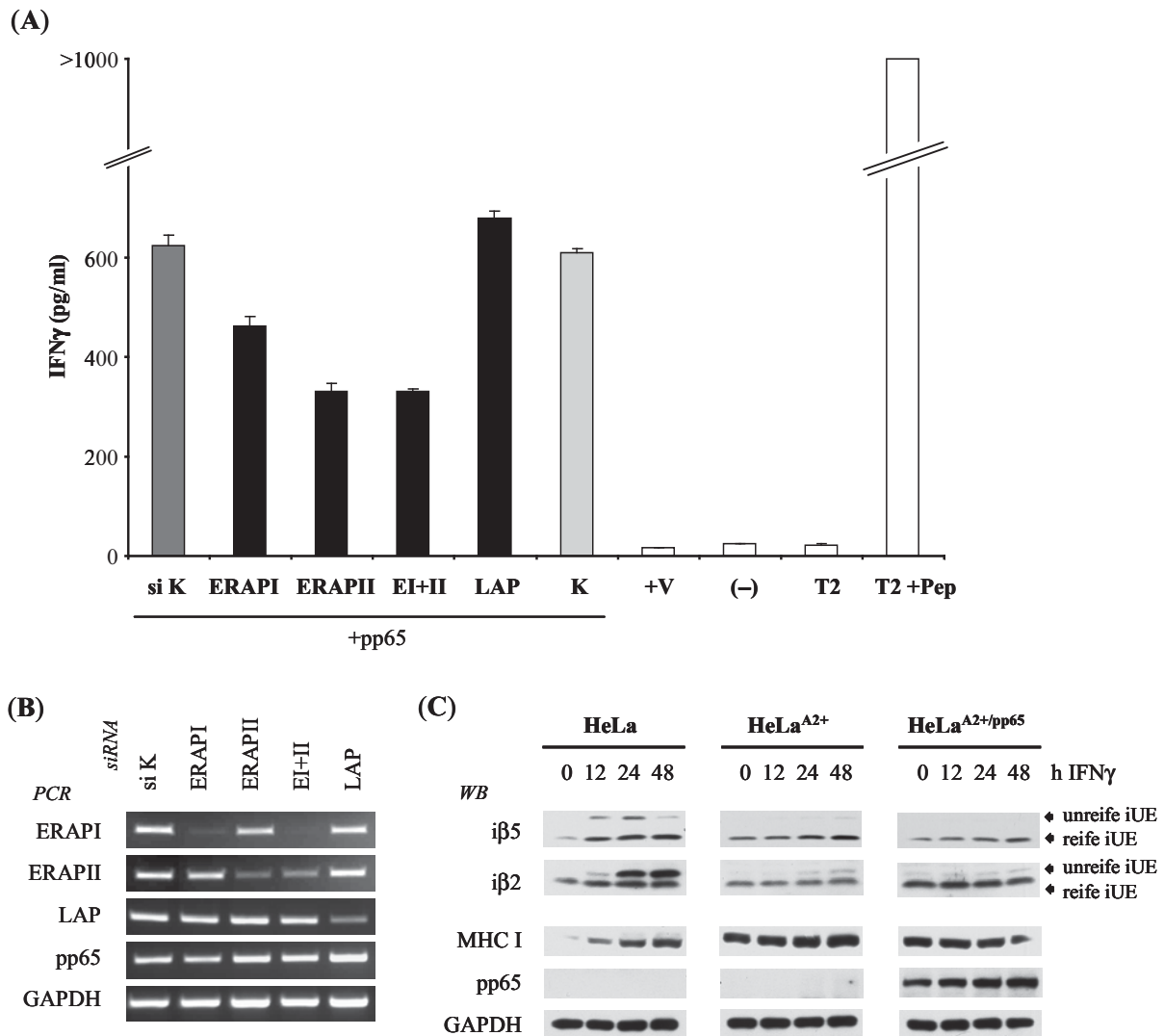


Abb.3.8: Stimulation pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischer CTL mit HeLa^{A2+/iP} Zellen nach siRNA *knockdown* von IFNγ-induzierbaren Aminopeptidasen. Die inhibierte Expression von ERAPI und ERAPII einzeln und auch in Kombination (EI+II) führte zu einer reduzierten CTL Antwort. **(A)** HeLa^{A2+/iP} Zellen wurden mit spezifischen siRNA gegen die angegebenen Aminopeptidasen bzw. mit Kontroll-siRNA (si K) für 48h inkubiert, transient mit pcDNA-pp65 transfiziert (+pp65) und anschließend mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifischen CTL kokultiviert. Die Auswertung der Epitopräsentation erfolgte indirekt über die Quantifizierung des freigesetzten IFNγ mittels ELISA. HeLa^{A2+/iP} Zellen unbehandelt (-) und mit Vektor (+V) transfiziert dienten als interne Expressionskontrollen. T2 Zellen mit (+Pep) und ohne pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptidbeladung dienten zur Kontrolle der CTL Spezifität. **(B)** Überprüfen des siRNA *knockdown* mittels RT-PCR. Total RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen Primern amplifiziert. GAPDH- und pp65-Expression dienten als Kontrollen der PCR-Reaktion. **(C)** Analyse der Induktion proteasomaler Immununtereinheiten (iUE) durch IFNγ. 50 bzw. 100µg Zelllysate der mit 200U/ml IFNγ stimulierten Zellen wurden mittels 10%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). (Der Assay wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung eines von drei repräsentativen Experimenten.)

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass aufgrund der Quantifizierung der pp65 Epitopräsentation über die Aktivierung von spezifischen CTL keine absoluten IFN γ Konzentrationswerte für die Auswertung herangezogen werden können. Durch unterschiedliche Reaktivität der eingesetzten CTL können nur relative Aussagen über die gesteigerte bzw. verminderte CTL Stimulation resultierend aus der veränderten Epitopräsentation vergleichend zu den Kontrollen getroffen werden.

Für LAP konnte entgegen den Erwartungen unter den gewählten Versuchsbedingungen keine wesentlich verbesserte CTL Reaktion detektiert werden, so dass LAP unter diesen Gegebenheiten keine destruktive Wirkung auf die pp65 Epitopräsentation ausübt.

Die Beobachtung, dass LAP im Zusammenhang mit dem iP weitestgehend ohne Einfluß auf die pp65 Epitopräsentation zu sein scheint, könnte möglicherweise durch einen erhöhten Substratumsatz des iP erklärt werden. Es könnten durch den effizienteren proteasomalen Abbau vermehrt Peptide im Zytosol vorliegen, die für den TAP Transport und die anschließende MHC Klasse I Präsentation zur Verfügung stehen. Daher würde der Degradation von pp65 Peptiden durch LAP unter diesen Bedingungen eine untergeordnete Bedeutung zukommen und ohne ausschlaggebenden Effekt auf die pp65 Präsentation bleiben. Für die Rolle des Immunoproteasoms bei einer HCMV Infektion könnte dies im Vergleich zum Standardproteasom bedeuten, dass die effizientere Proteindegradation durch das iP wichtig für eine effektive Immunantwort und damit für die Viruskontrolle ist.

3.9 Untersuchungen zur Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex*

Antigene Peptide aus dem Zytosol werden vorrangig über TAP ins ER transportiert und dort vermittelt durch den *peptide-loading complex* (PLC) auf MHC Klasse I Moleküle geladen, um als MHC/Peptid Komplex auf der Zelloberfläche zur Erkennung durch CTL präsentiert zu werden. Da bislang nicht geklärt ist, wie Peptide im ER vor einer Degradation durch ER Aminopeptidasen geschützt werden und wie die Kooperation von ER Aminopeptidasen mit dem PLC bei der „Peptidübergabe“ stattfinden könnte, sollte im Weiteren untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen die ER Aminopeptidasen mit dem PLC interagieren und damit eventuell selektiv auf das präsentierte Peptidrepertoire einwirken können.

Die Peptidbeladung von MHC Klasse I Molekülen erfolgt assoziiert im PLC unter Mithilfe verschiedener akzessorischer Moleküle durch einen streng regulierten Prozess. Der PLC wird durch die Assemblierung des heterodimeren TAP Transporters mit Tapasin (Tpn), dem Heterodimer MHC/ β 2m sowie den Chaperonen ERp57 und Calretikulin (CRT) gebildet. Die einzelnen Komponenten sind durch verschiedenartige Protein-Protein-Interaktionen verbunden, wobei die Disulfidbindung zwischen Tpn und ERp57 von besonderer Bedeutung sowohl für die Komplexstabilität als auch die selektive Peptidbeladung

zu sein scheint. Wird ein hoch affines Peptid gebunden, dissoziiert der PLC und der MHC/Peptid Komplex gelangt zur Präsentation.

Aufgrund der postulierten einflussreichen Rolle der ER Aminopeptidasen in der Generierung von MHC Klasse I Liganden könnte eine räumliche Nähe zum PLC bzw. eine mögliche Interaktion angenommen werden. Basierend auf gegensätzlichen experimentellen Befunden bezüglich des Wirkmechanismus von ER Aminopeptidasen gibt es jedoch keine einheitliche Auffassung darüber. Es wird kontrovers diskutiert, ob ERAPI am MHC I Molekül gebundene Peptide trimmen kann und demzufolge in Abhängigkeit von MHC Klasse I Molekülen agiert. Eine physikalische Assoziation von ER Aminopeptidasen mit MHC Molekülen bzw. dem PLC konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Die folgenden Experimente sollten weitere Erkenntnisse diesbezüglich bringen.

3.9.1 Die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem PLC wird durch IFN γ induziert

Um dieser umstrittenen Frage nachzugehen, ob die ER Aminopeptidasen einzeln oder zusammen mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex* interagieren, wurden Immunpräzipitationsexperimente (IP) durchgeführt. Im Vordergrund stand dabei die Überlegung, dass unter Infektionsbedingungen durch den Einfluß von IFN γ eine verstärkte Antigenpräsentation und damit verbunden eine vermehrte Assemblierung des PLC sowie erhöhte Expression der ER Aminopeptidasen induziert wird. Daher wurde angenommen, dass es unter Stimulationsbedingungen vorrangig zu einer Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem PLC kommen könnte, um den Ansprüchen einer effizienteren Antigenprozessierung genügen zu können.

Für die spezifischen Präzipitationsexperimente wurden daher Zelllysate von unbehandelten sowie IFN γ -stimulierten HeLa Zellen verwendet und die Eluate im Western Blot auf die Anwesenheit der ER Aminopeptidasen neben den PLC Komponenten untersucht.

Die Expressionsanalysen von IFN γ -behandelten im Vergleich zu unbehandelten HeLa Zellen zeigten die Induktion der Expression von ERAPI, Tpn, TAP1 und MHC I (**Abb.3.9.1A**). Eine erhöhte Expression von ERAPII nach IFN γ Stimulation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Durch die Kopräzipitationsexperimente konnte eine Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem PLC gezeigt werden (**Abb.3.9.1B**). In den Eluaten der IP α Tpn konnten erwartungsgemäß alle Komponenten des *peptide-loading complex*, TAP1, MHC I, CRT und ERp57, detektiert und somit die vollständige Assemblierung des PLC in HeLa Zellen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde über die Detektion von ERAPII eine Koimmunpräzipitation (koIP) dieser Aminopeptidase mit Tpn gezeigt, welche für ERAPI nur unter Einfluß von IFN γ nachgewiesen werden konnte. Die Analyse der Eluate der IP α ERAPII zeigte ebenfalls eine koIP von Tpn sowie ERp57. Zudem waren CRT und MHC I nachweisbar. Die TAP1 Untereinheit des Transporters und ERAPI konnten nur unter Stimulationsbedingungen detektiert werden. Entsprechende Resultate ergaben sich durch die Analyse der Eluate der IP α ERAPI. Durch die spezifische Präzipitation von ERAPI konnten hier Tpn und auch weitere Komponenten des PLC

kopräzipitiert und durch Western Blot Analysen nachgewiesen werden. So waren zudem ERp57, MHC I und CRT detektierbar. Die Detektion von TAP1 war wiederum nur nach IFN γ Induktion möglich. Eine Assoziation mit ERAPII konnte hingegen in Zelllysaten von sowohl unstimulierten als auch IFN γ -behandelten Zellen festgestellt werden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl ERAPI als auch ERAPII mit dem PLC interagiert und zudem diese Interaktion, den detektierten Signalintensitäten zu folge, vorrangig durch IFN γ induziert wird, da unter diesen Bedingungen eine Intensitätszunahme für Tpn, TAP1, MHC I sowie ERAPI in allen IP-Varianten zu beobachten war.

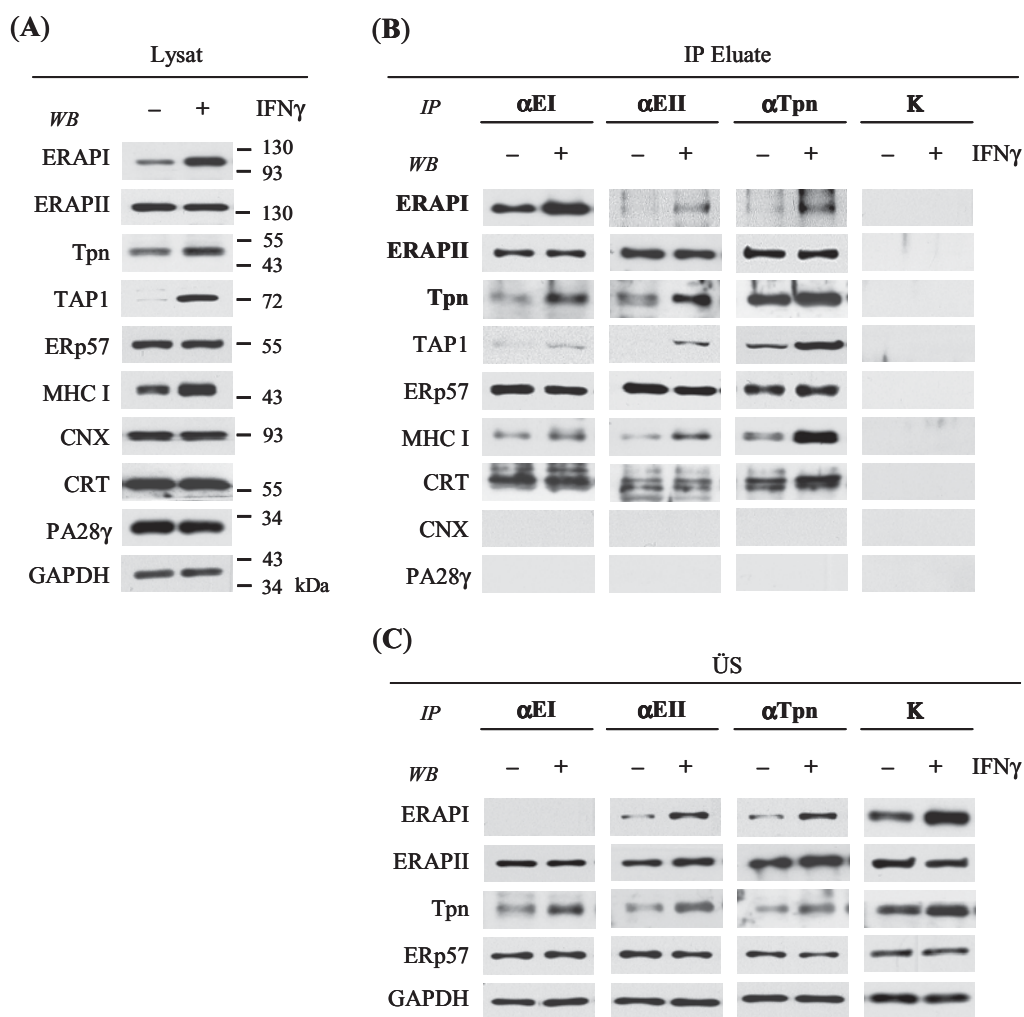


Abb.3.9.1: Immunpräzipitation – ER Aminopeptidasen interagieren mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex* (PLC). Diese Interaktion wurde durch IFN γ verstärkt. Es wurden Lysate von unbehandelten (-) und mit 200U/ml IFN γ für 36h stimulierten (+) HeLa Zellen verwendet. (A) 10 μ g Zelllysate wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). (B) Die ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII kopräzipitierten mit Komponenten des PLC. Für die Immunpräzipitation wurden an CN-Br-Sepharose-beads gekoppelte spezifische Ak verwendet. Die Ak-beads wurden mit 0,5 bzw. 1mg Lysat für 4h bei 4°C rotierend inkubiert, anschließend gewaschen und das Präzipitat in 1x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate (15 bzw. 20 μ l) wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert. Zur Kontrolle (K) wurde ein unspezifischer Maus-Ak mitgeführt. (C) 5 μ l IP-Überstand (ÜS) wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). (Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen wurde dargestellt.)

Die Spezifität der Präzipitationsexperimente wurde zum einen durch die Analyse der Eluate auf Calnexin (CNX), einem an der Faltung von MHC Klasse I Molekülen beteiligtes Chaperon im ER, und auf PA28 γ , einem Proteasom-assoziierten Protein aus dem Kern, überprüft. Für beide unbeteiligten Proteine konnte kein positiver Nachweis erbracht werden. Zum anderen wurde ein Kontroll-Ak für IP Experimente in analoger Versuchsdurchführung mitgeführt, in deren Eluaten keines der untersuchten Proteine detektiert werden konnte. Somit stellen die aufgrund von Koimmunpräzipitation erhaltenen Proteinnachweise eine spezifische Interaktion der detektierten Proteine dar.

Die Analysen der Überstände machen deutlich (**Abb.3.9.1C**), dass keine vollständige Präzipitation, ERAPI ausgenommen, des gewünschten Proteins aus dem Zelllysate erreicht wurde, so dass die dargestellten Ergebnisse nicht unbedingt die tatsächlichen relativen molekularen Verhältnisse widerspiegeln. Darüber hinaus lassen die bisherigen Erkenntnisse keinen Rückschluss auf die direkten Interaktionspartner zwischen PLC und ER Aminopeptidasen zu.

3.9.2 Direkte Interaktion der ER Aminopeptidasen mit Tapasin

Die vorangegangenen Befunde der Präzipitationsexperimente α Tpn zeigten, dass Tpn sowohl mit ERAPI als auch in höherem Maße mit ERAPII interagiert. In den folgenden Experimenten sollte dies einen ersten Ansatzpunkt darstellen, um zu klären, über welche Komponente(n) die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem PLC stattfinden könnte. Um eine mögliche Interaktion von ERAPI und ERAPII mit Tpn näher untersuchen zu können, wurde mittels siRNA Transfektion die Expression von Tpn in unbehandelten sowie mit IFN γ stimulierten HeLa Zellen inhibiert. Die Präzipitationsexperimente α ERAPI und α ERAPII wurden wie zuvor durchgeführt und die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot Analysen auf die Anwesenheit von ERAPI, ERAPII und Tpn überprüft.

Die Expressionsanalysen der unstimulierten mit Kontroll-siRNA behandelten im Vergleich zu stimulierten bzw. mit spezifischer siRNA behandelten Zellen zeigten (**Abb.3.9.2A**) zum einen die IFN γ Induktion der Expression von ERAPI und Tpn (si K/+) und zum anderen eine deutlich verminderte Tpn Expression aufgrund von siRNA *knockdown* (siTpn). Die weiteren Analysen der Eluate demonstrierten erneut eine induzierte koIP von Tpn durch ERAPI bzw. ERAPII aus Lysaten der stimulierten im Vergleich zu unstimulierten mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (**Abb.3.9.2B**), wodurch die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden konnten. Des Weiteren konnte diese nachgewiesene induzierte Interaktion von ERAPI bzw. ERAPII mit Tpn durch die verminderte Tpn-Expression ebenso reduziert werden. Demzufolge wird weniger Tpn durch ERAPI bzw. ERAPII kopräzipitiert, wenn die Tpn-Expression mittels siRNA inhibiert wird, wodurch eine direkte Interaktion angenommen werden könnte. Aufgrund der leicht erniedrigten Signale von ERAPI bzw. ERAPII in der entsprechenden koIP der Proben mit Tpn siRNA könnte vermutet werden, dass hier eine Abhängigkeit von Tpn vorliegt.

Diese Befunde geben einen ersten Hinweis für die direkte Interaktion der ER Aminopeptidasen mit Tpn, so dass ein konkreter Nachweis mittels Interaktionsstudien erbracht werden könnte. Weitere Details über

den Interaktionsmechanismus von ERAPI und ERAPII mit dem PLC, beispielsweise ob ERAPI und ERAPII einzeln mit Tpn und/oder eventuell anderen Komponenten interagieren, müssen eingehender analysiert werden.

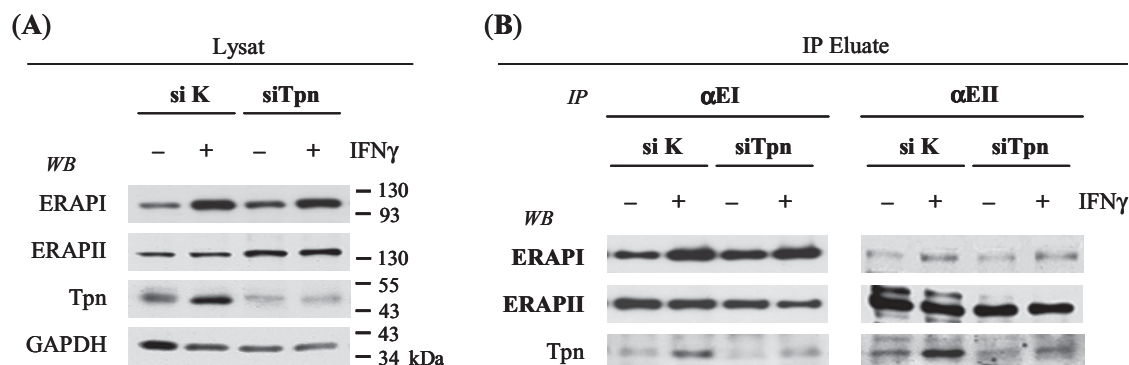


Abb.3.9.2: Immunpräzipitation – ER Aminopeptidasen interagieren über Tapasin mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex*. HeLa Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen Tapasin (siTpn) bzw. Kontroll-siRNA (si K) für 72h inkubiert, unbehandelt belassen (-) oder für die letzten 36h mit 200U/ml IFN γ (+) stimuliert. **(A)** 20 μ g Zelllysate wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). Es konnte eine deutlich verminderte Tapasinoxpression nach siRNA nachgewiesen werden. **(B)** Die ER Aminopeptidasen ERAPE (EI) und ERAPEII (EII) interagierten mit Tpn. Für die Immunpräzipitation wurden an CN-Br-Sepharose-beads gekoppelte spezifische Ak verwendet. Die Ak-beads wurden mit 1mg Lysat für 4h bei 4°C rotierend inkubiert, anschließend gewaschen und das Präzipitat in 1x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate (20 μ l) wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert. Zur Kontrolle (K) wurde ein unspezifischer Maus-Ak mitgeführt (Daten nicht abgebildet). (Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen wurde dargestellt.)

3.9.3 Die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem PLC erfolgt TAP-unabhängig

Um einen näheren Einblick in die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem *peptide-loading complex* zu bekommen, sollte im Folgenden TAP als essentielle Komponente des PLC betrachtet werden. Da Tpn ebenfalls mit TAP im PLC interagiert, besteht die Möglichkeit, dass die bisher nachgewiesene Assoziation von ERAPE und ERAPEII mit Tpn über TAP vermittelt wird. Für die folgenden Experimente wurden daher TAP1/2-defiziente T2 Zellen verwendet, in denen eine stabile Interaktion von Tpn mit MHC I Molekülen nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der TAP Defizienz erfolgt jedoch keine ausreichende Versorgung mit MHC Klasse I Liganden, so dass der unvollständige PLC im ER retentiert wird.

Die Präzipitationsexperimente wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt und analysiert. Die Expressionsanalysen der T2 Zellen zeigten unabhängig von der TAP Defizienz die konstitutive Expression der ER Aminopeptidasen ERAPE und ERAPEII sowie aller Komponenten des PLC, ausgenommen TAP1 und TAP2 (**Abb.3.9.3A**; Daten nicht gezeigt). In den Eluates der IP α Tpn wurden erwartungsgemäß die Komponenten des *peptide-loading complex* MHC I, CRT und ERp57 detektiert, wodurch die dokumentiert stabile Interaktion von Tpn und MHC I bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde erneut über die Detektion von ERAPEII die Assoziation dieser Aminopeptidase mit Tpn

gezeigt, welche für ERAPI nur äußerst schwach nachgewiesen werden konnte (**Abb.3.9.3B**). Die Analyse der Eluate der IP α ERAPII zeigte ebenfalls die Assoziation mit Tpn sowie die koIP von ERp57, CRT und MHC I, zudem war ERAPI nachweisbar. Vergleichbare Resultate ergaben sich durch die Analyse der Eluate der IP α ERAPI. Durch die spezifische Präzipitation von ERAPI konnten auch hier Tpn sowie ERp57 kopräzipitiert und im Western Blot nachgewiesen werden. Die Detektion von MHC I und CRT zeigte dagegen ein nur schwaches Signal. So konnte auch eine Assoziation mit ERAPII nur geringfügig nachgewiesen werden. Zusammenfassend bestätigen diese Befunde die bisherigen Ergebnisse aus HeLa Zellen und machen deutlich, dass die Interaktion der ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII mit dem PLC einerseits TAP-unabhängig verläuft und darauf basierend andererseits über Tpn stattfinden könnte.

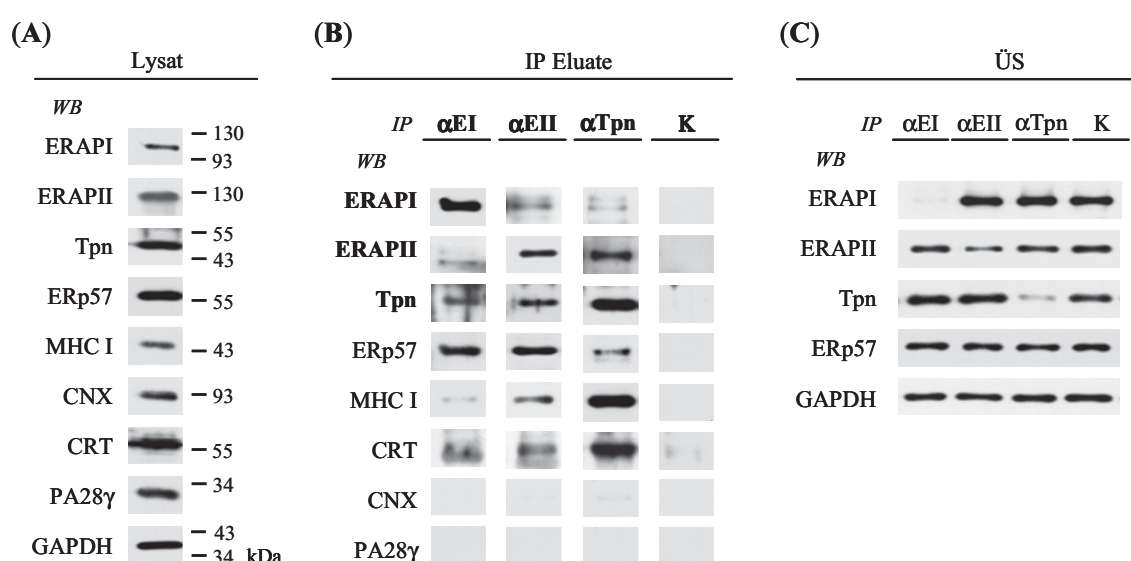


Abb.3.9.3: Immunpräzipitation – die Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex* ist TAP-unabhängig. Es wurden TAP-defiziente T2 Zellen verwendet. **(A)** 10 μ g Zelllysate wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). **(B)** Die ER Aminopeptidasen ERAPI (EI) und ERAPII (EII) interagieren trotz TAP Defizienz mit Tapasin. Für die Immunpräzipitation wurden an CN-Br-Sepharose-beads gekoppelte spezifische Ak verwendet. Die Ak-beads wurden mit 0,5 bzw. 1 mg Lysat für 4 h bei 4°C rotierend inkubiert, anschließend gewaschen und das Präzipitat in 1x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate (15 bzw. 20 μ l) wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert. Zur Kontrolle (K) wurde ein unspezifischer Maus-Ak verwendet. **(C)** 5 μ l IP-Überstand (ÜS) wurden mittels 8%iger SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Ak inkubiert (GAPDH – Proteinladekontrolle). (Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen wurde dargestellt.)

Bei den Analysen dienten wiederum CNX und PA28 γ als unbeteiligte Proteine zur Kontrolle der Spezifität der Präzipitationsexperimente und zeigten keinerlei Signale in den analysierten Proben. Zudem wurde in IP Experimenten mit einem Kontroll-Ak keines der untersuchten Proteine detektiert. Somit können die mittels koIP nachgewiesenen Proteininteraktionen als spezifisch angesehen werden.

Durch Überprüfen der Überstände auf ERAPI, ERAPII und Tpn Expression nach entsprechender IP konnte eine effiziente (aber dennoch unvollständige) Präzipitation des gewünschten Proteins aus

Zelllysaten demonstriert werden, da jeweils ein deutlich reduziertes Signal detektiert wurde (**Abb.3.9.3C**).

Basierend auf den bisherigen Befunden kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Interaktion der ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex* offenbar über eine direkte Assoziation mit Tpn stattfindet. Dabei kann eine Kooperation von ERp57 jedoch nicht ausgeschlossen werden und bedarf der weiteren Überprüfung. Der TAP Transporter scheint nachweislich in diese Interaktion nicht involviert zu sein. Die direkte Assoziation der ER Aminopeptidasen mit MHC Klasse I Molekülen wird eher ausgeschlossen, da der Nachweis in der koIP als Tpn-abhängig gedeutet wird. Zudem ist die Rolle von CRT in dieser Interaktion schwierig zu interpretieren, daher bleibt der konkrete Interaktionspartner der ER Aminopeptidasen im PLC durch weiterführende Experimenten zu identifizieren. Darüber hinaus muß die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion für die Prozessierung von antigenen Peptiden und damit der Antigenpräsentation analysiert werden.

3.10 HCMV pp65 Prozessierungsmodell

Auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird folgendes Modell (**Abb.3.10**) für die zellulären Abläufe während der Prozessierung des viralen Proteins pp65 in Bezug auf die Generierung des Epitops pp65₄₉₅₋₅₀₃ postuliert:

Bei der Infektion mit HCMV wird das Virus in die Zelle internalisiert und pp65 aus dem Tegument direkt in das Zytoplasma freigesetzt. Dort wird das virale Protein Proteasom-abhängig abgebaut, wobei das Immunoproteasom gegenüber dem Standardproteasom eine höhere Effizienz aufweist. Die zwei Proteasomentypen unterscheiden sich dabei nicht in ihrer Schnittspezifität jedoch in ihrer Schnittfrequenz. Durch das Proteasom werden nachweislich das HLA-A2-restringierte pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop sowie drei N-terminal verlängerte 10, 11 und 14mer Vorläuferpeptide gebildet. Die generierten Peptide werden durch postproteasomal agierende Aminopeptidasen getrimmt bzw. abgebaut. Die Aminopeptidasen TPPII, AP-B, POP und die IFN γ -induzierbare LAP zerschneiden die pp65 Peptide und führen damit zu einer verminderten Epitopräsentation. Dies konnte durch eine verstärkte CTL Reaktion in Abwesenheit dieser Aminopeptidasen verdeutlicht werden. Die Aminopeptidasen BH, PSA und TOP hingegen sind ohne signifikanten Einfluß auf die pp65 Epitopräsentation. Des Weiteren wird eine konstruktiv wirkende Aminopeptidase im Zytoplasma vermutet, die bisher nicht identifiziert werden konnte. Durch den TAP Transporter werden antigene Peptide aus dem vorherrschend destruktiven Klima des Zytoplasmas ins ER transportiert. Das pp65 14mer Vorläuferpeptid wird jedoch nicht von TAP gebunden und unterliegt damit der dominierenden Degradation im Zytoplasma. Das Epitop hingegen wird sehr gut durch TAP ins ER transportiert. Zudem gelangen die 10 und 11mer Vorläuferpeptide über TAP ins ER, wenn

auch in geringerem Umfang. Die ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII erfüllen durch N-terminales Trimmen der Vorläuferpeptide eine bedeutende Funktion in der Epitopräsentation. Eine verminderte Expression der ER Aminopeptidasen führte zu einer stark reduzierten CTL Reaktion. Final wird das Epitop im *peptide-loading complex* auf MHC Klasse I Moleküle geladen und über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche gebracht. Dort wird der MHC/Peptid Komplex von spezifischen zytotoxischen T Lymphozyten erkannt und die infizierte Zelle eliminiert.

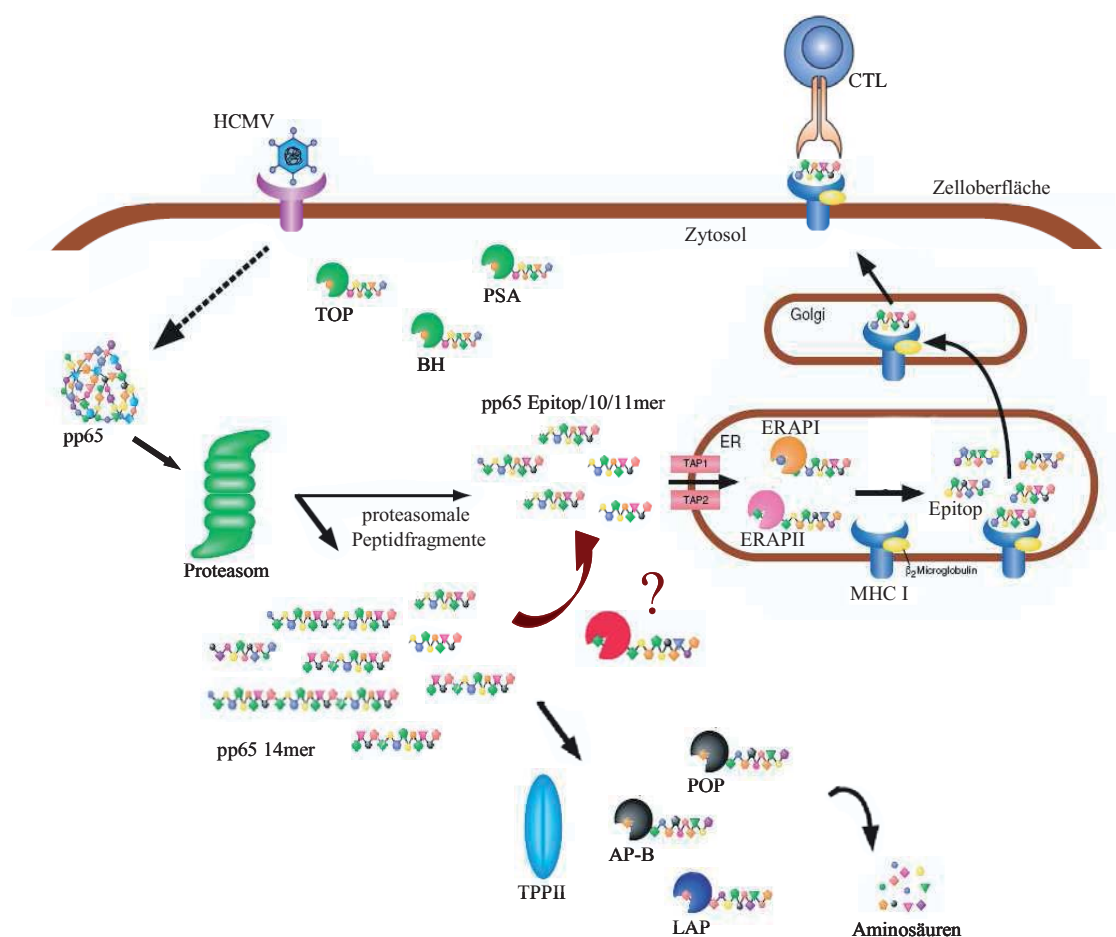


Abb.3.10: HCMV pp65 MHC Klasse I Antigenprozessierungsmodell. Nach Infektion der Zelle durch HCMV wird pp65 in das Zytosol freigesetzt und dort durch das Proteasom abgebaut. Das Proteasom generiert dabei unter anderem das immundominante HLA-A2-restringierte pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop und auch N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide. Die entstehenden proteasomalen Peptidfragmente werden vorrangig durch zytosolische Aminopeptidasen (TPPII, LAP, AP-B, POP) zu einzelnen Aminosäuren degradiert. Einige Aminopeptidasen sind ohne Effekt (BH, PSA, TOP). Eine konstruktiv wirkende Aminopeptidase im Zytosol konnte nicht identifiziert werden. Das 9mer Epitop und auch 10 und 11mer Vorläuferpeptide werden über TAP in das ER transportiert, wo diese durch die ER Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII getrimmt werden können. Das Epitop wird final auf MHC Klasse I Moleküle geladen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Dort kann der MHC/Peptid Komplex von spezifischen CTL erkannt und die infizierte Zelle eliminiert werden. (Abbildung abgeändert nach (Hattori und Tsujimoto, 2004).)

4 Diskussion

4.1 Die Prozessierung des HCMV Phosphoproteins pp65

Über die Relevanz der physiologischen Funktion von Aminopeptidasen innerhalb der Antigenprozessierung ist bislang wenig bekannt. In der MHC Klasse I Antigenpräsentation können Aminopeptidasen durch N-terminales Trimmen zur Generierung von Epitopen beitragen oder aber durch Degradation von antigenen Peptiden limitierend auf deren Präsentation wirken.

In dieser Arbeit wurde die Prozessierung des HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops in *in vitro* Experimenten sowie im zellulären System eingehender untersucht, um neben dem Proteasom beteiligte Peptidasen zu identifizieren, die eine Modifikation der Epitoppräsentation bewirken. Insbesondere der Einfluß von IFN γ -induzierbaren Aminopeptidasen, die unter Infektionsbedingungen die benötigte erhöhte Trimmaktivität gewährleisten können, wurde im Zusammenhang mit dem ebenfalls durch IFN γ induzierten Immunoproteasom näher untersucht.

4.1.1 Das virale pp65 Protein wird durch das Immunoproteasom effizienter prozessiert

In verschiedenen Studien im Maussystem wurde durch separaten *knockout* der proteasomalen Immununtereinheiten die variable Rolle des Immunoproteasoms speziell bei einer antiviralen Immunantwort untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass LMP2 (i β 1) -defiziente Mäuse sich nicht wie LMP7 (i β 5) -defiziente Mäuse durch eine reduzierte MHC Klasse I Zelloberflächenpräsentation auszeichnen, sondern eine veränderte Hierarchie der Immundominanz in der CD8⁺ T Zellantwort gegen Influenza A Virus-Epitope aufweisen, wobei die veränderte Immunogenität einiger Epitope auf einer modifizierten Präsentation, die anderer Epitope auf Veränderungen im T Zellrepertoire basiert (Fehling *et al.*, 1994; Van Kaer *et al.*, 1994; Chen, W. *et al.*, 2001). Infektionsstudien mit lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) in LMP2 und LMP7 *knockout* Mäusen bestätigten jedoch, dass grundsätzlich die Mehrzahl der MHC Klasse I Liganden ohne LMP2 und LMP7 nach wie vor generiert werden kann. Die LMP2 bzw. LMP7-defizienten Mäuse etablierten eine starke, dem Wildtyp entsprechende, LCMV-spezifische CTL Reaktion (Nussbaum *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu zeigten MECL-1 (i β 2) -defiziente Mäuse nach LCMV Infektion eine deutlich reduzierte CTL Reaktion, die für das Epitop gp276 nicht auf eine veränderte Präsentation, sondern auf die verminderte Anzahl an spezifischen T Zellen zurückzuführen war. Die MECL-1-Defizienz scheint hier einen modulatorischen Effekt auf die Ausbildung des CD8⁺ T Zellrepertoires auszuüben (Basler *et al.*, 2006). Demzufolge beeinflusst das Immunoproteasom die T Zellantwort scheinbar nur gegen eine begrenzte Anzahl von viralen Epitopen.

Das Immunoproteasom weist gegenüber dem Standardproteasom keine grundlegend veränderte proteolytische Aktivität auf, generiert jedoch zumeist verschiedene antigene Peptide effizienter und bildet damit ein quantitativ divergierendes Repertoire an möglichen MHC Klasse I Liganden (Kuckelkorn *et al.*, 1995). Vor allem für virale Antigene wurde eine optimierte Generierung durch das Immunoproteasom beschrieben (Sibille *et al.*, 1995; van Hall *et al.*, 2000; Van den Eynde und Morel, 2001). Sijts *et al.* belegten anhand ihrer Studien, dass Immunoproteasom-exprimierende MEC217 Zellen (Maus embryonale Zellen (MEC) 217 mit TET-regulierbarer Expression der transfizierten proteasomalen Immunountereinheiten) im Vergleich zu Kontrollzellen das Ad5 E1B₁₉₂₋₂₀₀ Epitop effizienter prozessieren und präsentieren und damit eine verbesserte CTL Reaktion induzieren (Sijts *et al.*, 2000b). Die *in vitro* Analysen mit aufgereinigtem 20S Proteasom aus Immunoproteasom-exprimierenden und unbehandelten MEC217 Zellen und einem Epitop-umfassenden synthetischen 40mer Peptid bestätigten die deutlich schnellere Degradation durch das Immunoproteasom und die effizientere Epitopgenerierung, die auf einer erhöhten Präferenz der entsprechenden Schnittstellen basiert. In einer theoretisch orientierten Studie zur Etablierung eines Kinetik-Modells für den proteasomalen Abbau wurde für das Modellantigen pp89 (IE1 MCMV) in *in vitro* Analysen ebenfalls eine erhöhte Umsatzrate des Immunoproteasoms gegenüber dem Standardproteasom nachgewiesen, wobei keine veränderten Präferenzen für die induzierten Schnittstellen zu beobachten waren (Peters, B. *et al.*, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Verdauanalysen mit HCMV pp65 Peptid ergaben mit diesen Studien übereinstimmende Resultate. Das Immunoproteasom zeigte im Vergleich zum Standardproteasom einen gesteigerten Umsatz des pp65 Peptids, wobei von beiden Proteasomentypen äquivalente Schnittstellen genutzt und der C-Terminus des betrachteten pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops durch einen Schnitt nach der hydrophoben Aminosäure Valin₅₀₃ effizient generiert wurde, so dass identische Peptidprodukte in unterschiedlicher Menge entstanden (**Abb.3.1b**). Die gesteigerte Produktion immunoproteasomal generierter pp65 Peptide und die damit verbundene verbesserte Epitopgenerierung konnte zudem im zellulären System gezeigt werden. Vergleichbar mit den Untersuchungen von Sijts *et al.* (2000) induzierten pp65 transfizierte Zellen, die die proteasomalen Immunountereinheiten konstitutiv exprimieren, im Vergleich zu Zellen ohne Immunoproteasomexpression eine signifikant stärkere CTL Reaktion (**Abb.3.1a**). Basierend auf diesen Beobachtungen ist anzunehmen, dass die schnelle und effiziente Antigenprozessierung durch das Immunoproteasom unter Infektionsbedingungen zu einer verstärkten Immunantwort führt.

Die MHC Klasse I Präsentation des pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops konnte bereits nach ca. 6h (transiente Transfektion) auf der Zelloberfläche mittels spezifischer CTL detektiert werden. Da pp65 aufgrund seiner Funktion bei der Virusassemblierung ein relativ stabiles Protein ist, könnte diese frühe Präsentation auf dem effizienten Abbau über den DriP-Weg beruhen, wodurch eine schnelle antivirale Immunreaktion etabliert werden kann. Sogenannte DriPs sind defekte Translationsprodukte, die ihre native Struktur nicht erreichen und daher unmittelbar durch das Proteasom abgebaut werden. Die Rolle des DriP-Wegs für das adaptive Immunsystem wurde durch eine Studie deutlich, die die inverse Korrelation zwischen der

Stabilität des Antigens und der Generierung von MHC Klasse I antigenen Peptiden bzw. dem damit verbundenen Ausmaß der CTL Reaktion demonstrierte (Goldwich *et al.*, 2008). Anhand eines Modellantigens, das auf dem HIV gag Protein fusioniert mit Ubiquitin basiert, wurde gezeigt, dass die durch ein Degradationssignal destabilisierte Variante dieses Modellantigens zu einer verbesserten Antigenpräsentation und Aktivierung von CD8⁺ T Zellen führt.

Der proteasomale Abbau von viralen Proteinen kann sowohl Ubiquitin-abhängig als auch -unabhängig erfolgen, wie es für das Hepatitis B Virus (HBV) X Protein und das Hepatitis C Virus (HCV) core Protein beschrieben wurde (Kim, J. H. *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2009). Weitere Studien zeigten, dass das HCV F Protein womöglich mit der $\alpha 3$ Untereinheit des 20S Proteasoms interagiert und das HCV core Protein einen Bindungspartner von PA28 γ darstellt (Suzuki *et al.*, 2009; Yuksek *et al.*, 2009), worüber jeweils der proteasomale Abbau Ubiquitin-unabhängig vermittelt werden könnte. Besold *et al.* zeigten in HCMV Infektionsstudien mit infizierten Fibroblasten, dass die Präsentation des pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops von der proteasomalen Aktivität abhängig ist (Besold *et al.*, 2007). Dementsprechend wurde die pp65₄₉₅₋₅₀₃ spezifische CTL Reaktion in Folge der Proteasominhibition aufgrund nachhaltig verminderter Epitoppräsentation nahezu vollständig aufgehoben (**Abb.3.1a**), so dass dies eine Bestätigung des proteasomalen Abbaus von pp65 war. Ob die proteasomale Degradation von pp65 Ubiquitin-vermittelt erfolgt, wurde experimentell bislang nicht nachgewiesen, könnte jedoch aufgrund der Proteinsequenz, die mehrere Lysinreste für eine mögliche Ubiquitinierung enthält, angenommen werden. Aufgrund der Translokation von pp65 in den Zellkern könnte auch ein Ubiquitin-unabhängiger proteasomaler Abbau vermittelt über PA28 γ ähnlich dem des HCV core Proteins stattfinden, wenn eine entsprechende Interaktion erfolgt. Ebenso wurde für das MCMV IE1 pp89 Protein die Generierung eines H-2L^d-restringierten Epitops durch das Proteasom beschrieben, wobei eine Ubiquitinierung von pp89 nicht nachgewiesen werden konnte (Voigt *et al.*, 2007).

4.1.2 Nur kurze pp65 Peptide werden effizient über TAP in das ER transportiert

Untersuchungen zum TAP Transport machten anhand der unterschiedlich effizienten Translokation verschiedener Epitope deutlich, dass der TAP Transporter aufgrund seiner Bindungspräferenzen das Repertoire der MHC Klasse I Liganden im ER beeinflussen kann. Ein entsprechendes Beispiel bieten die Studien von Lauvau *et al.*, in denen die TAP Affinitäten von zwei immundominanten viralen Epitopen analysiert wurden (Lauvau *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass die meisten untersuchten HLA-A2-restringierten Peptide von HBV und HCV eine niedrige TAP Affinität aufweisen. Für die zwei immundominanten Epitope HBV pol₅₇₅₋₅₈₃ und core₁₈₋₂₇ konnten N-terminal verlängerte Peptide mit hoher TAP Affinität identifiziert werden, die durch TAP in das ER gelangen und nach N-terminaler Prozessierung effizient als Epitope präsentiert werden.

Für die Peptid-TAP Bindung und Translokation sind die ersten drei N-terminalen Reste sowie der C-Terminus des Peptids relevant (Uebel *et al.*, 1997). Peptide mit C-terminal hydrophober oder basischer Aminosäure werden durch TAP präferentiell gebunden. Am N-Terminus (Position (P) 1) werden hydrophile oder geladene Aminosäuren wie Asparagin, in geringerem Maße Lysin und Arginin, in P2 hydrophobe oder geladene Aminosäuren wie Arginin oder (Iso)Leucin und in P3 aromatische oder hydrophobe Aminosäuren wie Tyrosin, nicht so sehr Tryptophan bevorzugt. Drastisch verminderte Affinitäten wurden für Peptide mit aromatischen oder sauren Aminosäureresten in P1, Prolin in P2 oder Glycin bzw. sauren Resten in P3 beobachtet, wodurch der TAP Transport beeinträchtigt wird (Schmitt und Tampe, 2000; Bhasin und Raghava, 2004).

Auf Grundlage dieser Bindungsspezifitäten könnten alle der getesteten pp65 9 bis 15mer Peptide (AGILARNLVPMVATV) durch TAP transportiert werden, da sie N-terminal wenigsten einen bevorzugten und keinen inhibitorisch wirkenden Aminosäurerest enthalten. Die Translokationsexperimente mit aufgereinigten Mikrosomen zeigten jedoch, dass neben dem Epitop nur die kurzen proteasomal gebildeten 10 und 11mer Vorläuferpeptide durch TAP in das ER transportiert werden (**Abb.3.2A**). Obwohl TAP vergleichbare Effizienzen für die Translokation von 8 bis 16As langen Peptidsubstraten aufweist (van Endert *et al.*, 1994), wurden alle weiteren pp65 Peptide von N-terminal zunehmender Länge ineffizient bzw. nicht von TAP gebunden (**Abb.3.2B**). Demnach gelangt der proteasomal generierte 14mer Epitopvorläufer vermutlich nicht in das ER und unterliegt daher der weiteren Prozessierung im Zytosol. Die variable N-terminale Aminosäuresequenz der einzelnen Peptide scheint daher für die unterschiedlichen TAP Affinitäten verantwortlich zu sein. Das Epitop besitzt eine dem Bindungsmotiv entsprechende Sequenz, so dass dieses nachweislich vorrangig über TAP ins ER transportiert wird. Das 10mer besitzt in P1 einen hydrophilen Argininrest, wodurch die Transporteffizienz im Vergleich zum Epitop etwas verringert wird. Das 11mer mit dem favorisierten basischen Argininrest in P2 wird effizienter als das 10mer transportiert, obwohl es in P1 und P3 keine bevorzugten Reste enthält. Das 12mer weist ebenfalls nur in P2 einen bevorzugten hydrophoben Rest auf, wird aber im Gegensatz zum 11mer nicht transportiert. Dementsprechend wird das 13mer trotz der hydrophoben Aminosäuren in P2 und P3 ebenfalls nicht durch TAP gebunden. Entgegen den Erwartungen wird auch das 14mer nicht von TAP transloziert, obwohl dessen Sequenz in Korrelation mit dem Bindungsmotiv ein hydrophiles Glycin in P1 und hydrophobe Aminosäuren in P2 und P3 aufweist. Zusammengefasst zeigen diese Analysen, dass die TAP Affinität neben der Peptidsequenz und -Länge wahrscheinlich zusätzlich von anderen Faktoren wie den strukturellen Eigenschaften vermittelt wird. Dies wird insbesondere dadurch deutlich, dass TAP unter bestimmten Umständen auch Peptide mit sperrigen bzw. großen Seitenketten toleriert (Gromme *et al.*, 1997), wie z.B. die Modifikation des Referenzpeptids mit einem Fluoreszenzfarbstoff.

4.1.3 Aminopeptidasen beeinflussen die pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation

Nur ein äußerst geringer Prozentsatz der proteasomal generierten Peptidfragmente wird final als MHC/Peptid Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert. Hauptsächlich werden diese Peptide durch postproteasomal agierende Aminopeptidasen im Zytosol und im ER degradiert (Yewdell, J. W. *et al.*, 2003). Die Beteiligung alternativer proteolytischer Systeme in der MHC Klasse I Antigenprozessierung neben dem Proteasom ist bereits beschrieben worden (Del-Val und Lopez, 2002). Die Rolle der Aminopeptidasen ist dennoch erst teilweise verstanden.

4.1.3.1 Proteasomale pp65 Vorläuferpeptide werden durch Aminopeptidasen im Zytosol vorrangig zerstört

Die durchgeführten Analysen zeigten, dass die zytosolischen Peptidasen TPPII, LAP, POP und AP-B die pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation negativ beeinflussen (**Abb.3.4**).

TPPII besitzt zwei verschiedene Arten proteolytischer Aktivität. Durch das N-terminale Abspalten von Aminosäuretripletts (exoproteolytische Aktivität) ist TPPII für den Abbau von Peptiden >15As verantwortlich (Reits, E. *et al.*, 2004), jedoch für die Präsentation der Mehrzahl von MHC Klasse I Liganden nicht notwendig (York *et al.*, 2006a). Übereinstimmend wurde in TPPII-defizienten Mäusen eine moderate, eher destruktive Rolle für TPPII in der MHC Klasse I Prozessierung ermittelt (Firat *et al.*, 2007a). Andererseits ist TPPII aufgrund der spezifischen endoproteolytischen Aktivität in der Lage, C-Termini von MHC Klasse I Liganden zu bilden. So konnte für die Generierung bestimmter Epitope eine Abhängigkeit von TPPII nachgewiesen werden (Levy *et al.*, 2002; Seifert *et al.*, 2003; Guil *et al.*, 2006). Durch ihre überwiegend exoproteolytische Aktivität könnte TPPII zum Trimmen des pp65 14mer Peptids im Zytosol beitragen und durch Abspalten des N-terminalen Tripeptids das 11mer generieren, welches im Vergleich zum 14mer über TAP ins ER gelangen kann. Dagegen wurde jedoch eine zerstörende Aktivität von TPPII für die pp65 Epitoppräsentation beobachtet. Obwohl Peptide <15As keine bevorzugten Substrate darstellen, kann TPPII diese umsetzen. Unterstützt wird diese Hypothese durch *in vitro* Verdauanalysen, die zeigten, dass 6 bis 30mer Peptidsubstrate durch aufgereinigtes TPPII vergleichbar gut prozessiert werden können, wobei eine geringe Präferenz für 8 bis 14mere zu verzeichnen war (York *et al.*, 2006a).

Im Gegensatz dazu weist die IFN γ -induzierbare Peptidase LAP, die als dominierende Trimmaktivität im Zytosol beschrieben wurde (Beninga *et al.*, 1998), eine Präferenz für kleinere 6 bis 9As lange Peptide auf. Neben der effizienten Hydrolyse von Leucinresten spaltet LAP einzelne hydrophobe Aminosäuren N-terminal ab. Durch die Überexpression von LAP in COS-7 Zellen wurde die MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche vermindert, da die erhöhte Peptidaseaktivität die Peptidmenge für die MHC I Beladung limitiert (Reits, E. *et al.*, 2003). Dies könnte bedeuten, dass eine Induktion der LAP Expression vor allem unter Infektionsbedingungen die MHC Klasse I Peptidpräsentation beeinträchtigt. LAP-

defiziente Mäuse zeigten jedoch weder eine reduzierte MHC I Zelloberflächenpräsentation noch eine veränderte Immunreaktion gegen die getesteten Epitope nach Virusinfektion (Towne *et al.*, 2005), wodurch der Einfluß von LAP auf die Generierung anderer Epitope jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. In Bezug auf die Prozessierung von pp65 wurde ebenfalls eine Limitierung der Epitopräsentation durch LAP nachgewiesen. Aufgrund der Längenpräferenz könnte LAP für die direkte Zerstörung des proteasomal generierten pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitops verantwortlich sein.

POP ist eine weitere zytosolische Peptidase, die die pp65 Epitopräsentation negativ beeinflusst. POP hydrolysiert Peptide präferentiell C-terminal von Prolinresten (Wilk, 1983). Aufgrund dessen wurde eine verminderte Epitopräsentation resultierend durch einen proteolytischen Schnitt nach P₄₉₈ innerhalb des Epitops erwartet. Die Epitopzerstörung durch POP konnte sowohl in *in vitro* Verdauexperimenten als auch im zellulären System nachgewiesen werden, wodurch für POP erstmalig ein Zusammenhang mit der MHC Klasse I Antigenprozessierung hergestellt werden konnte.

Die Peptidase AP-B wurde zuvor ebenfalls noch nicht im Kontext der MHC Klasse I Präsentation betrachtet und führte entgegen der beschriebenen Schnittpräferenz nach basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin (Hopsu *et al.*, 1964; Cadel *et al.*, 1995) ebenso zu einer verminderten pp65 Epitopräsentation. Aufgrund der Substratspezifität wurde eine Epitop-generierende Trimmaktivität von AP-B durch Abspalten des N-terminalen Arginins vom pp65 10mer Peptid angenommen. Diese proteolytische Aktivität konnte weder *in vitro* durch Verdauexperimente noch im zellulären System nachgewiesen werden. Für den *in vitro* Verdau von synthetischen Peptiden wurde rekombinante AP-B der Ratte, die eine 90%ige Sequenzhomologie zur humanen AP-B aufweist (Piesse *et al.*, 2002), verwendet. Dabei wurden unabhängig von der Peptidlänge unkonventionelle Schnittpräferenzen C-terminal der Aminosäuren Asparagin₄₉₅ und Methionin₄₉₉ innerhalb des Epitops aufgedeckt, wobei sowohl das Epitop als auch 10, 11 und 14mer Peptide *in vitro* prozessiert wurden (Daten nicht gezeigt). Da sich diese Epitopzerstörung im zellulären System in Form einer reduzierten pp65 Präsentation widerspiegelt, könnte angenommen werden, dass auch die humane AP-B die *in vitro* beschriebene antagonistische Aktivität besitzt. Weiterführende Experimente sollten Aufschluß darüber geben, ob AP-B eventuell in Abhängigkeit von der Sequenz des Peptidsubstrats endoproteolytische Schnitte induzieren kann.

Der spezifische *knockdown* der parallel untersuchten Aminopeptidasen TOP, BH und PSA bewirkte keine veränderte CTL Reaktion (**Abb.3.4**), so dass diese Peptidasen ohne signifikanten Einfluß auf die pp65 Prozessierung sind. Obwohl die Metalloendopeptidase TOP durch den Abbau antigener Peptide für die Limitierung der MHC Klasse I Expression verantwortlich gemacht wird (Saric *et al.*, 2001; York *et al.*, 2003), wurden die pp65 Peptide nicht durch TOP prozessiert. Saric *et al.* zeigten, dass TOP vorrangig 9 bis 17As lange Peptide zu kürzeren 6 bis 9mer Produkten umsetzt, wodurch viele MHC Klasse I Liganden mit einer Bindungslänge von 8 bis 10As zerstört werden (Saric *et al.*, 2004). Für die Aminopeptidasen PSA und BH wurde ebenfalls eine Beteiligung an postproteasomalen Trimmprozessen beschrieben. Stolze *et al.* zeigten, dass diese Peptidasen zusätzliche N-terminale Aminosäuren abspalten können und somit postproteasomal das virale Epitop VSV NP₅₂₋₅₉ bilden (Stoltze *et al.*, 2000). Die

Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass die Trimmaktivität beider Peptidasen nicht am N-Terminus des Epitops stoppt und dieses daher im selben Zug zerstört werden kann. Zudem besitzt BH eine endoproteolytische Schnittpräferenz für Arginin und hätte hypothetisch zum Trimmen der pp65 Peptide beitragen können. Die proteolytische Aktivität von PSA und BH war jedoch ohne Auswirkungen auf die pp65 Epitoppräsentation. Ob PSA und BH in Kooperation miteinander bzw. mit anderen Aminopeptidasen bei der pp65 Prozessierung agieren, wie es beispielsweise für die Generierung des RU₁₃₄₋₄₂ Epitops durch TPPII und PSA beschrieben wurde (Levy *et al.*, 2002), könnte durch den kombinierten *knockdown* der Peptidasen deutlich werden. BH/LAP doppel-*knockout* Mäuse zeigten jedoch keine wesentlichen Veränderungen in ihrer Immunreaktion, was einen Epitop-spezifischen Effekt, wie er für gp276 beschrieben wurde, dennoch nicht ausschließt (Towne *et al.*, 2007).

Zusammengefasst konnte durch den spezifischen *knockdown* einzelner zytosolischer Aminopeptidasen keine pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitop-generierende Aktivität in diesem Zellkompartiment identifiziert werden. Statt dessen zeigte sich, dass TPPII, LAP, AP-B und POP die pp65 Epitoppräsentation limitieren. Demzufolge unterliegt vor allem das pp65 14mer Peptid, da es nicht durch TAP transportiert wird, der Prozessierung im Zytosol. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit der Auffassung, dass antigene Peptide im Zytosol überwiegend degradiert werden (Reits, E. *et al.*, 2003).

In Experimenten mit einem 14mer Minigenkonstrukt wurden diese Befunde bestätigt. Durch die separate Expression des 14mer Peptids konnte dessen Relevanz in der pp65 Epitoppräsentation überprüft und untersucht werden, ob die durch die entsprechenden Aminopeptidasen verminderte Präsentation vorrangig auf dem Abbau des 14mer Peptids beruht.

Der spezifische *knockdown* von TPPII und POP im Zusammenhang mit der pp65 14mer Peptidexpression führte wiederholt zu einer wirksamen Verbesserung der Epitoppräsentation, so dass diese Peptidasen das 14mer effizient degradieren. Für LAP und AP-B wurde in Folge des *knockdown* eine nur leicht verbesserte Epitoppräsentation detektiert, so dass diese Aminopeptidasen möglicherweise, wie bereits für LAP angenommen, vorrangig an der Degradation des Epitops bzw. der kurzen 10 und 11mer Peptide beteiligt sind und daher einen nicht so ausgeprägten Effekt auf die Prozessierung des 14mer Peptids ausüben. Für einen entsprechenden Vergleich könnten diese pp65 Peptide als Minigenkonstrukt in analoger Versuchsdurchführung transfiziert und so Aufschluß darüber erhalten werden, ob auch diese zum Teil im Zytosol abgebaut werden oder direkt über TAP ins ER gelangen und nur dort der finalen Prozessierung unterliegen.

Für die beobachtete pp65 Epitoppräsentation in Folge der Transfektion des 14mer Minigenkonstrukts ist die Prozessierung des 14mer Peptids im Zytosol Voraussetzung. Daher könnte durch eine andere zytosolische Aminopeptidase das 14mer zum Epitop bzw. 10 oder 11mer Peptid getrimmt werden, die im Gegensatz zum 12 bzw. 13mer Peptid durch TAP ins ER transportiert werden können. Die Identifizierung weiterer in Trimmprozesse von pp65 Peptiden involvierter Peptidasen erfordert ergänzende Untersuchungen.

Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass aufgrund der erheblichen Überexpression des 14mer Peptids dieses als Substrat dem Proteasom unabhängig von einer Ubiquitinierung zugänglich wird. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass ohne Proteasominhibition eine äußerst starke CTL Reaktion verzeichnet wurde. Die detektierte Eitoppräsentation unter Epoxomicineinfluß wäre dann auf proteasomale Restaktivität zurückzuführen. Demnach bleibt die Frage offen, ob im Zytosol eine generierende Peptidase für die pp65 Eitoppräsentation vorhanden ist.

4.1.3.2 Trimmen durch Aminopeptidasen im ER ist für die effiziente pp65₄₉₅₋₅₀₃ Eitoppräsentation notwendig

Durch Analysen von ERAAP-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass das Trimmen von antigenen Peptiden im ER essentiell für die Generierung eines 'normalen' Peptidrepertoires für die MHC Klasse I Präsentation ist (Hammer *et al.*, 2006; York *et al.*, 2006b). Die vorangegangenen TAP Translokationsstudien zeigten, dass neben dem pp65 Eitop die 10 und 11mer Vorläuferpeptide in das ER transportiert werden und dort Substrate für ER Aminopeptidasen darstellen. Somit können ERAPI und ERAPII durch N-terminales Abspalten der bis zu zwei Eitop-verlängernden Aminosäuren Alanin und Arginin zur pp65₄₉₅₋₅₀₃ Eitopgenerierung beitragen oder aufgrund weiterer Peptiddegradation dessen Präsentation vermindern. Die durchgeführten *knockdown* Experimente von ERAPI und ERAPII machten deutlich, dass Prozessierungsvorgänge im ER großen Anteil an der pp65₄₉₅₋₅₀₃ Eitoppräsentation haben und damit ERAPI und II für die effiziente Generierung notwendig sind (**Abb.3.7**).

ERAPI und ERAPII weisen unterschiedliche Substratspezifitäten auf. ERAPI schneidet bevorzugt C-terminal von hydrophoben und ERAPII C-terminal von basischen Aminosäuren, wobei ERAPII auch Dipeptide N-terminal abspalten kann. Aufgrund dieser ergänzenden Trimmaktivitäten können ERAPI und II in der Antigenprozessierung kooperativ zusammenwirken. Saveanu *et al.* zeigten anhand eines 15mer Vorläuferpeptids abgeleitet vom HIV env Protein, dass das effiziente Trimmen der N-terminalen Elongation von hydrophoben und basischen Aminosäuren die kombinierte Aktivität beider ER Aminopeptidasen erfordert, wodurch *in vitro* das entsprechende 9mer Eitop generiert wird (Saveanu *et al.*, 2005). Für ERAPI werden dabei zwei gegensätzliche Wirkmechanismen diskutiert. Einerseits wurde das N-terminale Trimmen von Vorläuferpeptiden im ER in Abhängigkeit des entsprechenden MHC Klasse I Allels postuliert (Komlosch *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass in Abwesenheit des restringierten MHC I Moleküls antigene Peptide durch ERAAP entweder nicht N-terminal getrimmt (Brouwenstijn *et al.*, 2001) oder degradiert werden (Kanaseki *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Befunden wird das Trimmen von MHC-gebundenen Peptiden postuliert, so dass MHC Klasse I Moleküle als Matrize fungieren und dadurch protektiv für ihre Liganden wirken. Andererseits zeigte jedoch eine Studie von Fruci *et al.* mit präparierten Mikrosomen aus humanen B Zellen, dass das Trimmen von Vorläuferpeptiden im ER unabhängig von MHC Klasse I Molekülen stattfinden kann und notwendig für eine stabile MHC/Peptid Komplexbildung ist (Fruci *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde aufgrund von *in*

vitro Verdauanalysen mit verschiedenen N-terminal verlängerten Peptidserien und rekombinantem humanen ERAPI die Hypothese des *molecular ruler* Mechanismus etabliert (Chang *et al.*, 2005). Dieser These zur Folge bindet ERAPI die längeren Peptidsubstrate über ihren freien C-Terminus in einer gestreckten Substratbindungsgrube und prozessiert diese bis zu 8 oder 9meren. Dieser Mechanismus wird sowohl durch die Längenpräferenz als auch durch die Sequenzabhängigkeit der ERAPI Aktivität gestützt (York *et al.*, 2002; Evnouchidou *et al.*, 2008).

In Bezug auf die Prozessierung der pp65 Peptide im ER könnten aufgrund der beschriebenen Schnittpräferenzen die 10 und 11mer Vorläuferpeptide vorrangig durch ERAPII auf die funktionale Länge getrimmt werden. ERAPI könnte zudem vor allem durch Abspalten des N-terminalen hydrophoben Alaninrests vom 11mer Peptid zur Epitopgenerierung beitragen. Eine Degradation der pp65 Peptide durch ERAPI wurde in den durchgeführten Experimenten anhand der pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation nicht nachgewiesen. Allein durch diese Beobachtungen kann jedoch nicht unterschieden werden, ob dies auf das Vorhandensein des restringierten HLA-A2 Allels zurückgeführt werden könnte oder der limitierten Trimmaktivität von ERAPI nach dem *molecular ruler* Mechanismus entspricht. Die *in vitro* Verdauexperimente von synthetischem pp65 Peptid mit rekombinantem humanen ERAPI zeigten dem *molecular ruler* Mechanismus entsprechend, dass das 9mer Epitop durch ERAPI nicht weiter degradiert wird (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde das Mart-1₂₆₋₃₅ Epitop, das aufgrund des Aminosäureaustauschs A27L eine dem pp65 Epitop vergleichbare MHC Bindungsaffinität besitzt, effizient durch ERAPI abgebaut, wodurch die Hypothese der protektiv wirkenden MHC Klasse I Moleküle unterstützt wird. Dabei bleibt zu prüfen, ob in Anwesenheit des restringierten MHC I Allels die Degradation des Mart-1₂₆₋₃₅ Epitops aufgrund dessen affiner MHC Bindung verhindert wird. ERAPI agiert demnach jedoch unabhängig von MHC Klasse I Molekülen.

Für ERAPII ist der molekulare Mechanismus bisher nicht eingehender untersucht worden. ERAPII kann Peptide so weit trimmen, dass sie zu kurz für eine Bindung an MHC Klasse I Moleküle sind. Aufgrund dessen könnte hier eine schnelle Übertragung des prozessierten Peptids auf MHC Klasse I Moleküle basierend auf einer gesteigerten Bindungsaffinität als Schutzmechanismus vor dessen weiteren Abbau fungieren. Durchflußzytometrische Analysen bezüglich der MHC-Peptid-Bindung von synthetischen Peptiden mit T2 Zellen zeigten, dass pp65 9 bis 15mer Peptide durch MHC I Moleküle auf der Zelloberfläche gebunden werden können, dass jedoch die Affinität mit zunehmender Peptidlänge abnimmt (Daten nicht gezeigt). Demzufolge wird durch den Trimmprozess die Bindungsaffinität zu MHC Klasse I Molekülen erhöht. Um eine effiziente „Peptidübergabe“ vom *Trimming*-Enzym zum MHC I Molekül zu ermöglichen, wäre zudem eine lokale Annäherung, wie z.B. im *peptide-loading complex*, von Vorteil. Entgegen der bisherigen Annahme der nicht überlappenden Trimmaktivitäten (Saveanu *et al.*, 2005) von ERAPI und ERAPII agieren diese in der pp65 Prozessierung parallel bzw. redundant und tragen gleichermaßen zur Epitopgenerierung bei. Nach separatem *knockdown* von ERAPI und II gab es keinen signifikanten Unterschied in der detektierten pp65 Epitoppräsentation und der beobachtete Effekt konnte durch den simultanen *knockdown* beider ER Aminopeptidasen nicht gesteigert werden. Basierend

auf den proteolytischen Schnittpräferenzen wurde jedoch für ERAPII eine potentiell wichtigere Funktion für das Trimmen der 10 und 11mer Vorläuferpeptide im ER erwartet. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass Unterschiede in den siRNA Effekten bzw. der Stabilität der Enzyme mit Auswirkungen auf die Resultate nicht ausgeschlossen werden können, da ERAPI und ERAPII zudem unterschiedlich stark in der humanen Zelle exprimiert werden.

4.1.4 Der Einfluß von Aminopeptidasen auf die pp65₄₉₅₋₅₀₃ Epitoppräsentation ist in Kooperation mit dem Immunoproteasom variabel

Es wird angenommen, dass unter Infektionsbedingungen eine gesteigerte Trimmaktivität erforderlich wird, da das Immunoproteasom einen effizienteren Substratumsatz zeigt und dabei vermehrt N-terminal elongierte Peptidvorläufer bildet. Entsprechend wurde für den Peptidtransporter TAP gezeigt, dass seine laterale Mobilität in der ER-Membran von dem verfügbaren intrazellulären Peptidgehalt beeinflusst wird, wobei die Mobilität abnimmt, wenn TAP Peptide transportiert (Reits, E. A. *et al.*, 2000). Damit ist die Aktivität von TAP abhängig vom Substrat und wird durch ein erhöhtes Angebot gesteigert. In diesem Zusammenhang könnten insbesondere IFN γ -induzierbare Aminopeptidasen im Zytosol und ER eine wichtige Rolle in der Epitopgenerierung spielen, um der geforderten Trimmaktivität nachzukommen.

Für die Untersuchungen, welchen Einfluß die erhöhte immunoproteasomale Peptidproduktion auf die pp65 Epitoppräsentation ausübt, wurden Zellen verwendet, die die proteasomalen Immununtereinheiten konstitutiv exprimieren. Da im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen nur das Proteasom als einziger Parameter variiert wurde, ist die Expression der an der MHC Klasse I Antigenprozessierung beteiligten Proteine unverändert und nur die produzierte Peptidmenge im Zytosol entscheidend.

Das Immunoproteasom bildet gegenüber dem Standardproteasom vermehrt pp65 Peptide (**Abb.3.1b**), die für den TAP Transport und die MHC Klasse I Präsentation zur Verfügung stehen. Da demzufolge die TAP Aktivität erhöht wird, werden mehr Peptide ins ER transportiert. Aufgrund der TAP Präferenz für das pp65 Epitop verändert sich dabei zusätzlich die Qualität des pp65 Peptidrepertoires im ER. Unter diesen Bedingungen war für die zwei IFN γ -induzierbaren ER Aminopeptidasen gegenüber den vorangegangenen Versuchen zu erwarten, dass sich der positive Einfluß von ERAPI und II durch N-terminales Trimmen der pp65 10 und 11mer Vorläuferpeptide verringert, da vorrangig das Epitop ins ER gelangt, das keiner weiteren Prozessierung bedarf. Für ERAPI war ein verminderter Effekt zu beobachten. Eine weitere mögliche Erklärung dafür wäre jedoch, dass ERAPI gegenüber ERAPII potentiell weniger an den Trimmprozessen der Vorläuferpeptide beteiligt ist. Der *knockdown* von ERAPII führte erneut zu einer stark verminderten Epitoppräsentation vergleichbar mit den vorangegangenen Experimenten (**Abb.3.8**). Es kann daher angenommen werden, dass ERAPII eine bedeutendere Funktion unter Infektionsbedingungen erfüllt.

Die zytosolische IFN γ -induzierbare Peptidase LAP ist an der pp65 Epitopzerstörung beteiligt, in Kooperation mit dem Immunoproteasom konnte jedoch nur eine marginal erhöhte CTL Reaktion in Folge der LAP Inhibition detektiert werden. Davon ausgehend, dass LAP das 9mer Epitop als Substrat bevorzugt, wird die Epitop-zerstörende Aktivität durch die verbesserte Epitopgenerierung durch das Immunoproteasom weitestgehend aufgehoben, so dass sich der erhöhte Substratumsatz vorteilhaft auf die Antigenpräsentation auswirkt. Die Degradation von pp65 Peptiden durch LAP scheint unter diesen Bedingungen keinen bedeutenden Effekt auf die Epitoppräsentation auszuüben.

Für die Rolle des Immunoproteasoms bei einer HCMV Infektion könnte dies im Vergleich zum Standardproteasom bedeuten, dass die effizientere Proteindegradation wichtig für eine effektive Immunantwort und damit für die Viruskontrolle ist. Hierbei scheint das für verschiedene Epitope unterschiedlich ausgeprägte Zusammenspiel zwischen Proteasom und Aminopeptidasen entscheidend zu sein.

4.2 Die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem *peptide-loading complex*

4.2.1 ERAPI und ERAPII als Komponenten des MHC Klasse I *peptide-loading complex*

Basierend auf den kontroversen Standpunkten zu dem Wirkmechanismus von ERAPI, ob ERAPI in Abhängigkeit von MHC Klasse I Molekülen oder als *molecular ruler* agiert, wurden Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem MHC Klasse I *peptide-loading complex* (PLC) durchgeführt. Einerseits wird postuliert, dass MHC Klasse I Moleküle als Matrizen dienen und daher das Trimmen der gebundenen Vorläuferpeptide durch ERAPI auf die funktionale Länge beschränken (Kanaseki *et al.*, 2006). Dem entgegen steht die These, dass ERAPI für die Trimmaktivität den frei zugänglichen C-Terminus des Peptidsubstrats benötigt, das bis zum 9 bzw. 8mer Peptid umgesetzt wird, wobei ERAPI sowohl Sequenz- als auch Längenspezifität aufweist (Chang *et al.*, 2005) (Abschnitt 1.2.2 und 4.1.3.2). Die Integration der ER Aminopeptidasen in den PLC könnte zu einer verbesserten Antigenpräsentation führen, da die sequenziell ablaufenden Teilschritte des effizienten Trimmens durch die Peptidasen und des Beladens der MHC Klasse I Moleküle im PLC räumlich assoziiert wären. Der MHC Klasse I *peptide-loading complex*, assembliert aus MHC/ β 2m, TAP1/2, Tapasin, ERp57 und Calretikulin (Abb.1.3), ist für die selektive Beladung naszierender MHC Klasse I Moleküle mit antigenen Peptiden verantwortlich, wobei Tapasin sowohl strukturell als auch funktionell die zentrale Komponente darstellt (Ortmann *et al.*, 1997; Chen, M. und Bouvier, 2007). In Abwesenheit von Tapasin kann der PLC nicht vollständig assemblieren, so dass keine effiziente MHC-Peptid-Beladung und -Präsentation stattfindet. Aber auch durch Deletion einer anderen Komponente ist der PLC in Struktur und Funktion beeinträchtigt (Peaper und Cresswell, 2008b).

Durch Immunpräzipitationsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass sowohl ERAPI als auch ERAPII mit Komponenten des PLC interagieren, wobei diese Interaktion nach IFN γ Stimulation verstärkt war. Demzufolge sind ERAPI und ERAPII Bestandteil dieses Komplexes.

Unter stimulatorischen Bedingungen konnte in HeLa Zellen für ERAPII im Gegensatz zu ERAPI keine durch IFN γ induzierbare Proteinexpression nachgewiesen werden. In Jurkat Zellen (T Zellen) hingegen wurde unter analogen Stimulationsbedingungen eine entsprechende Induktion von ERAPI und ERAPII auf Proteinebene detektiert (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte sich im Vergleich, dass unstimulierte HeLa Zellen allgemein ein relativ hohes Expressionsniveau von ERAPII aufweisen, so dass sich sowohl das Expressionsniveau von ERAPII als auch dessen Induzierbarkeit als Zelltyp-abhängig darstellen. Diese Beobachtung wird durch Studien bestätigt, die zeigen, dass das Expressionsniveau von ERAPII sowie die Induzierbarkeit durch IFN γ in unterschiedlichsten Zelllinien variiert (Tanioka *et al.*, 2003; Fruci *et al.*, 2006). Insbesondere in Tumorzellen wurde eine heterogene Expression von ERAPI und ERAPII nachgewiesen, die aufgrund veränderter Trimmfähigkeiten im ER als *immune escape* Mechanismus wirken könnte (Fruci *et al.*, 2008). Da zusätzlich die MHC Klasse I Expression mit der von ERAPI verbunden zu sein scheint (Fruci *et al.*, 2006), geht eine verminderte Expression der ER Aminopeptidasen mit einer reduzierten MHC I Zelloberflächenexpression einher, wodurch sich die Tumorzelle der Immunerkennung entziehen kann. Eine mögliche Erklärung der differentiellen ERAPII Expression könnte ein unterschiedliches Expressionsniveau der an der Regulation beteiligten Transkriptionsfaktoren in den einzelnen Zelllinien sein. Die Genregulation von ERAPII ist über *interferon regulatory factor* (IRF) - Promotorelemente gesteuert und damit kooperativ durch IRF und PU.1 Transkriptionsfaktoren reguliert (Tanioka *et al.*, 2005).

4.2.2 Mögliche Interaktionskomponenten des PLC für ERAPI und ERAPII

Hammer *et al.* stellten basierend auf den bisherigen Erkenntnissen, jedoch ohne den konkreten experimentellen Nachweis die These auf, dass Tapasin entweder durch direkte Assoziation mit ERAAP oder durch Unterstützen der Assemblierung des PLC, das Zusammenwirken von MHC Klasse I Molekülen und ERAAP ermöglicht (Hammer *et al.*, 2007b).

Tapasin ist als zentrale Komponente des MHC Klasse I *peptide-loading complex* für die Rekrutierung der weiteren Komplex-assoziierten Moleküle sowie deren Assemblierung verantwortlich (Momburg und Tan, 2002) und könnte daher mit den ER Aminopeptidasen interagieren. Neu synthetisiertes Tapasin assoziiert zunächst mit dem TAP Transporter, unmittelbar gefolgt von der Konjugatbildung mit ERp57. Dieser Subkomplex assembliert mit dem MHC/ β 2m Dimer, das wiederum an Calretikulin gebunden ist (**Abb.4.1A**). Im vollständig assemblierten PLC fungiert Tapasin als Bindeglied zwischen dem Peptidtransporter TAP und MHC Klasse I Molekülen (Tan *et al.*, 2002). Gleichzeitig ist Tapasin kovalent über eine Disulfidbrücke an ERp57 gebunden (Peaper *et al.*, 2005), wobei das gesamte intrazelluläre

Tapasin an ERp57 konjugiert vorliegt (Garbi *et al.*, 2006). Das Tapasin/ERp57 Dimer ist für das selektive Beladen der MHC Klasse I Moleküle mit hoch-affinen Peptiden verantwortlich (Garbi *et al.*, 2007; Wearsch und Cresswell, 2007).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass sowohl ERAPI als auch ERAPII mit Tapasin assoziiert sind, wobei eine starke Induktion dieser Assoziation durch IFN γ beobachtet werden konnte (**Abb.3.9.1**). Für die TAP1 Untereinheit des Transporters und MHC I wurde analog zu Tapasin eine Induktion durch IFN γ detektiert, was für ERAPII bedeuten könnte, dass diese Proteine mit Tapasin und nicht direkt durch ERAPII kopräzipitieren, da ERAPII nicht induziert wird. Andererseits ist eine gesteigerte Proteininteraktion nicht notwendigerweise von einer induzierten Proteinexpression abhängig. Zusätzlich war die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit Tapasin durch den *knockdown* von Tapasin deutlich reduziert (**Abb.3.9.2**). Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass ERAPI und II direkt mit Tapasin interagieren. Da jedoch Tapasin unter anderem mit MHC Klasse I sowie ERp57 verbunden ist, besteht die Möglichkeit, dass Tapasin als Bindeglied zwischen diesen Komponenten und den ER Aminopeptidasen fungiert. MHC I und ERp57 wären daher ebenfalls als direkte Interaktionspartner für ERAPI und II möglich. Der Nachweis von Tapasin in der ERAPI bzw. ERAPII Immunpräzipitation wäre dann auf eine indirekte Kopräzipitation, z.B. über ERp57, zurückzuführen und umgekehrt.

ERp57 wurde unabhängig von der IFN γ Stimulation kopräzipitiert, so dass die direkte Interaktion mit ERAPII angenommen werden kann. Diese Interaktion könnte auch außerhalb des PLC stattfinden, so dass das Heterodimer aus ERp57 und ERAPII durch Tapasin in den PLC rekrutiert wird. Dadurch ließen sich möglicherweise die konstanten Signale für ERp57 und die Zunahme nach IFN γ für Tapasin erklären. Die Bildung eines ERAPII/ERp57 Heterodimers im ER könnte im Zusammenhang mit der sequentiellen Assemblierung des PLC stehen, die Funktionalität eines solchen Heterodimers in der Zelle ist jedoch unklar.

Aufgrund der Befunde, dass ERAPI induzierbar und verstärkt unter Stimulationsbedingungen mit Tapasin bzw. ERAPII interagiert, könnte ein von ERAPII unterschiedlicher Interaktionspartner angenommen werden. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der TAP Transporter jedoch nicht als direkter Bindungspartner dient. Durch Analysen von TAP-defizienten Zellen wurden weiterhin ERp57, Tapasin, MHC I sowie Calretikulin (CRT) assoziiert mit ERAPI bzw. ERAPII nachgewiesen (**Abb.3.9.3**), so dass die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem PLC unabhängig von TAP stattfindet. Die Beobachtungen bestätigen, dass Tapasin in TAP-defizienten Zellen stabil mit MHC I interagiert, wobei die Beladung von MHC Klasse I Molekülen teilweise mit TAP-unabhängigen Peptiden, wie z.B. Signalsequenzpeptiden, erfolgt. Die Interaktion von ERAPI und II mit dem *peptide-loading complex* ist demzufolge nicht von dessen vollständiger Assemblierung abhängig.

Die Assemblierung des PLC verläuft überwiegend durch Wechselwirkungen einzelner Domänen der verschiedenen Komponenten, nur Tapasin und ERp57 liegen kovalent gebunden vor (Abschnitt 1.1.3).

Für die Assoziation der ER Aminopeptidasen in den Komplex stellt sich die Frage, wie eine mögliche molekulare Interaktion erfolgen könnte (**Abb.4.1**).

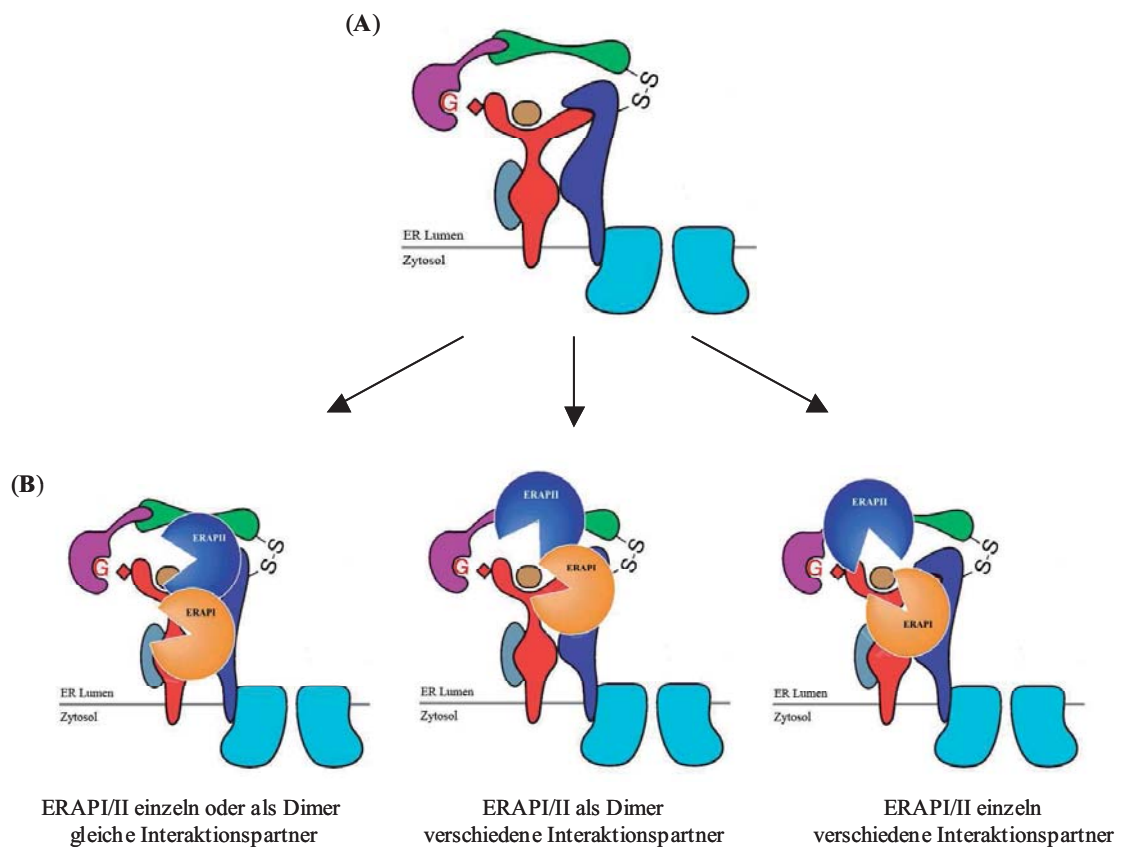


Abb.4.1: Der MHC Klasse I *peptide-loading complex* – mögliche Interaktionskomponenten für ERAPI und ERAPII. (A) Im PLC interagiert Tapasin (dunkelblau) als zentrale Komponente des Komplexes über die Transmembrandomäne mit dem TAP Transporter (hellblau) und über die luminalen Domänen mit dem MHC Klasse I Molekül (rot). Gleichzeitig ist Tapasin durch eine Disulfidbrücke (S-S) an ERp57 (grün) gebunden. Calretikulin (violett) erkennt die Glykosylierung (G) des MHC I Moleküls und überbrückt durch Assoziation mit ERp57 die Peptidbindungsgrube. (B) ERAPI und ERAPII können aufgrund der vorliegenden Daten auf unterschiedliche Art und Weise in den Komplex integriert werden, wobei die dargestellten Positionen der ER Aminopeptidasen austauschbar sind. (Abbildung abgeändert nach (Garbi *et al.*, 2007).)

Davon ausgehend dass Tapasin als direkter Interaktionspartner für ERAPI und/oder ERAPII fungiert, wobei die Nähe zum MHC Klasse I Molekül vorrangig sein sollte, ist die Wechselwirkung mit einem weiteren Protein durch die Assoziation mit TAP, MHC I und ERp57 beschränkt. Vor allem mögliche Kontaktstellen der ER luminalen Domänen von Tapasin sowie die räumliche Anordnung der Komponenten sind damit limitiert. Zudem ist Tapasin mit 48kDa ein relativ kleines Protein für die Assoziation der zwei ER Aminopeptidasen von ungefähr doppelter Größe. Das MHC Klasse I Molekül wird im Komplex durch CRT und ERp57 überbrückt sowie von Tapasin gebunden, so dass ebenfalls die räumliche Annäherung der Peptidasen eingeschränkt ist. Demzufolge könnte eine direkte Wechselwirkung mit ERp57 eventuell im Zusammenhang mit CRT angenommen werden. Beide ER Aminopeptidasen sind konventionelle Glykoproteine, die daher über das Zusammenspiel der Chaperone

Calnexin, CRT und ERp57 oxidativ gefaltet werden. Dies setzt eine molekulare Interaktion voraus, die Grundlage für eine Assoziation im PLC sein könnte.

Zudem wurden in der ERAPI bzw. ERAPII Immunpräzipitation die jeweils andere ER Aminopeptidase nachgewiesen, wodurch sich die Frage stellt, ob die beiden ER Aminopeptidasen einzeln oder als Heterodimer in den Komplex gebunden werden. ERAPI und II liegen zum geringen Anteil als Heterodimer in der Zelle vor (Saveanu *et al.*, 2005). Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie diese Dimerbildung erfolgt und welchem Zweck sie dient. Eine mögliche Erklärung ist die Assoziation dieser Dimere mit dem PLC, um dort kooperativ MHC Klasse I Liganden zu trimmen und eine schnelle Beladung zu ermöglichen. Andererseits könnten ERAPI und II separat und durch unterschiedliche Interaktionspartner in den Komplex integriert werden (**Abb4.1B**). Unterstützt wird eine getrennte Interaktion der ER Aminopeptidasen mit dem PLC durch die Beobachtung, dass sowohl durch ERAPII als auch durch Tapasin ohne IFN γ Induktion kein ERAPI kopräzipitiert wurde.

Zusammengefasst geben die vorliegenden Ergebnisse Hinweise darauf, dass verschiedene Populationen des *peptide-loading complex* unterschiedlicher molekularer Zusammensetzung existieren könnten. Der ERAPI Immunpräzipitation zur Folge ist in allen Komplexen mit ERAPI auch ERAPII gebunden. Im Gegensatz dazu ist in Komplexen mit ERAPII nicht unbedingt ERAPI assoziiert. Dies würde bedeuten, dass ERAPII konstitutiv im PLC integriert ist und ERAPI vorrangig unter Stimulationsbedingungen in den Komplex rekrutiert wird.

4.2.3 Mögliche Funktionen dieser Interaktion

Die ER Aminopeptidasen haben durch effizientes Trimmen von Epitopvorläufern bedeutenden Anteil an der MHC Klasse I Antigenprozessierung und Präsentation. Bislang ist jedoch wenig verstanden, wie die finalen MHC Klasse I Liganden vom Ort des Trimmens zum MHC I Molekül gelangen. Im Zytosol wurde für den Übergang der proteasomal generierten Peptide zum TAP Transporter die Assoziation mit Chaperonen wie TRiC und Hsp90 α diskutiert, die damit eine protektive Funktion übernehmen können (Kunisawa und Shastri, 2003,2006). Im ER könnte die „Peptidübergabe“ durch die physikalische Interaktion der beteiligten Komponenten begünstigt werden. Da der molekulare Mechanismus der ER-Peptidasen unklar ist, müssen weiterführende Experimente zeigen, ob dabei die Peptide bereits gebunden an MHC I Moleküle vorliegen oder aufgrund von wechselnden Bindungsaffinitäten die Peptidübergabe angetrieben wird. Trimmt ERAPI freie Peptide, können diese innerhalb des PLC auf kurzem Weg zum MHC I Molekül gelangen. Es wurde beschrieben, dass prozessierte 8 oder 9mer Peptide eine geringere Affinität als ihre Vorläuferpeptide zu ERAPI besitzen (Chang *et al.*, 2005). Ein MHC I Peptidligand mit hoher Affinität für sein MHC Klasse I Molekül löst sich demzufolge schnell von ERAPI, um an MHC I zu binden und entgeht damit einer weiteren Degradation und umgekehrt. Die Epitoppräsentation würde somit durch ERAP und MHC I Moleküle beeinflusst werden (Kanaseki und Shastri, 2008). Dies wäre

zugleich eine mögliche Erklärung für die Hypothese, dass MHC Klasse I Moleküle protektiv wirken. Sowohl im Zusammenhang mit der Hypothese des *molecular ruler* Mechanismus als auch mit der Hypothese der MHC-abhängigen Aktion von ERAPI ist die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem PLC vorteilhaft.

Einige Studien konnten belegen, dass das Trimmen von Vorläuferpeptiden im ER strikt von der Präsenz des restringierten MHC Klasse I Moleküls abhängig ist (Komlosch *et al.*, 2001) und das murine ERAAP ohne diesen Peptidliganden degradiert (Kanaseki *et al.*, 2006). Für die humane ERAPI hingegen wurde die Längen-limitierte Trimmaktivität beschrieben (Chang *et al.*, 2005). Möglicherweise ist der molekulare Mechanismus Spezies-spezifisch. Ein bedeutender Unterschied ist zusätzlich, dass bisher nur im humanen System eine zweite ER Aminopeptidase, ERAPII, identifiziert wurde. Der molekulare Mechanismus von ERAPII ist bisher unbekannt und könnte dem von muriner ERAAP entsprechen. Da bisher im Maussystem die Interaktion der ER Aminopeptidase mit dem PLC nicht nachgewiesen werden konnte, könnte diese Interaktion in der humanen Zelle vorrangig durch ERAPII vermittelt werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass durch die Assoziation der ER Aminopeptidasen mit dem PLC die Antigenprozessierung und -Präsentation vor allem unter Infektionsbedingungen gesteigert wird – unabhängig von dem tatsächlichen molekularen Trimmmechanismus. Durch weiterführende Experimente sollen die spezifischen Interaktionspartner von ERAPI und ERAPII identifiziert werden. Da die Eliminierung jeder einzelnen Komponente aus dem Komplex zu einer allgemeinen Destabilisierung bzw. Dysfunktion des PLC führt (Peaper und Cresswell, 2008b) und zudem andere zelluläre Prozesse beeinflusst werden, könnten Tapasin-Mutanten eingesetzt werden, wodurch die Interaktion mit MHC I und/oder ERp57 gestört wird. Durch weitere Immunpräzipitationsexperimente über Tapasin könnte so die jeweils nicht interagierende Komponente als direkter Bindungspartner für ERAPI bzw. ERAPII ausgeschlossen werden, vorausgesetzt die ER Aminopeptidasen werden weiterhin kopräzipitiert, und Tapasin als alleinige Interaktionskomponente bestätigt werden. Entsprechend kann dies über Präzipitation von ERAPI bzw. ERAPII geprüft werden. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten dann durch direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien verifiziert werden. Die rekombinante Expression der einzelnen Komponenten bietet eine weitere Möglichkeit, um die vielschichtigen Interaktionen genauer zu analysieren und strukturelle sowie funktionelle Abhängigkeiten aufzuklären. Ein zu prüfender Aspekt wäre zudem die Bedeutung der Proteindisulfidisomerase, die angeblich mit dem PLC ebenfalls assoziiert sein soll (Park *et al.*, 2006).

5 Literaturverzeichnis

- Altrich-VanLith, M. L., M. Ostankovitch, J. M. Polefrone, C. A. Mosse, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and V. H. Engelhard (2006). "Processing of a class I-restricted epitope from tyrosinase requires peptide N-glycanase and the cooperative action of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and cytosolic proteases." *J Immunol* **177**(8): 5440-50.
- Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf and O. Mandelboim (2005). "Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus." *Nat Immunol* **6**(5): 515-23.
- Arrode, G. and C. Davrinche (2003). "Dendritic cells and HCMV cross-presentation." *Curr Top Microbiol Immunol* **276**: 277-94.
- Bangia, N. and P. Cresswell (2005). "Stoichiometric tapasin interactions in the catalysis of major histocompatibility complex class I molecule assembly." *Immunology* **114**(3): 346-53.
- Bangia, N., P. J. Lehner, E. A. Hughes, M. Surman and P. Cresswell (1999). "The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex." *Eur J Immunol* **29**(6): 1858-70.
- Basler, M., J. Moebius, L. Elenich, M. Groettrup and J. J. Monaco (2006). "An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice." *J Immunol* **176**(11): 6665-72.
- Belhacene, N., B. Mari, B. Rossi and P. Auberger (1993). "Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation." *Eur J Immunol* **23**(8): 1948-55.
- Benham, A. M., M. Gromme and J. Neefjes (1998). "Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading." *J Immunol* **161**(1): 83-9.
- Beninga, J., K. L. Rock and A. L. Goldberg (1998). "Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase." *J Biol Chem* **273**(30): 18734-42.
- Besold, K., N. Frankenberg, S. Pepperl-Klindworth, J. Kuball, M. Theobald, G. Hahn and B. Plachter (2007). "Processing and MHC class I presentation of human cytomegalovirus pp65-derived peptides persist despite gpUS2-11-mediated immune evasion." *J Gen Virol* **88**(Pt 5): 1429-39.
- Bhasin, M. and G. P. Raghava (2004). "Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM." *Protein Sci* **13**(3): 596-607.
- Bhutani, N., P. Venkatraman and A. L. Goldberg (2007). "Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation." *Embo J* **26**(5): 1385-96.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." *Nature* **329**(6139): 506-12.
- Bochtler, M., L. Ditzel, M. Groll, C. Hartmann and R. Huber (1999). "The proteasome." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 295-317.
- Bromme, D., A. B. Rossi, S. P. Smeekens, D. C. Anderson and D. G. Payan (1996). "Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional expression, and enzymatic characterization." *Biochemistry* **35**(21): 6706-14.
- Brouwenstijn, N., T. Serwold and N. Shastri (2001). "MHC class I molecules can direct proteolytic cleavage of antigenic precursors in the endoplasmic reticulum." *Immunity* **15**(1): 95-104.
- Cadel, S., T. Foulon, A. Viron, A. Balogh, S. Midol-Monnet, N. Noel and P. Cohen (1997). "Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 2963-8.
- Cadel, S., A. R. Pierotti, T. Foulon, C. Creminon, N. Barre, D. Segretain and P. Cohen (1995). "Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules." *Mol Cell Endocrinol* **110**(1-2): 149-60.
- Cangemi, G., B. Morandi, A. D'Agostino, C. Peri, R. Conte, G. Damonte, G. Ferlazzo, R. Biassoni and G. Melioli (2003). "IFN-alpha mediates the up-regulation of HLA class I on melanoma cells without switching proteasome to immunoproteasome." *Int Immunol* **15**(12): 1415-21.
- Cappiello, M., V. Alterio, P. Amodeo, A. Del Corso, A. Scaloni, C. Pedone, R. Moschini, G. M. De Donatis, G. De Simone and U. Mura (2006). "Metal ion substitution in the catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing compounds to leucyl aminopeptidase." *Biochemistry* **45**(10): 3226-34.
- Cardozo, C. and R. A. Kohanski (1998). "Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome"." *J Biol Chem* **273**(27): 16764-70.

- Cascio, P., C. Hilton, A. F. Kisselev, K. L. Rock and A. L. Goldberg (2001). "26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide." *Embo J* **20**(10): 2357-66.
- Castillo, J. P. and T. F. Kowalik (2002). "Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control." *Gene* **290**(1-2): 19-34.
- Chambers, J. E., C. E. Jessop and N. J. Bulleid (2008). "Formation of a major histocompatibility complex class I tapasin disulfide indicates a change in spatial organization of the peptide-loading complex during assembly." *J Biol Chem* **283**(4): 1862-9.
- Chang, S. C., F. Momburg, N. Bhutani and A. L. Goldberg (2005). "The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47): 17107-12.
- Chee, M. and B. Barrell (1990). "Herpesviruses: a study of parts." *Trends Genet* **6**(3): 86-91.
- Chen, M. and M. Bouvier (2007). "Analysis of interactions in a tapasin/class I complex provides a mechanism for peptide selection." *Embo J* **26**(6): 1681-90.
- Chen, W., C. C. Norbury, Y. Cho, J. W. Yewdell and J. R. Bennink (2001). "Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens." *J Exp Med* **193**(11): 1319-26.
- Chevillotte, M., S. Landwehr, L. Linta, G. Frascaroli, A. Luske, C. Buser, T. Mertens and J. von Einem (2008). "The major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages." *J Virol*.
- Coffino, P. (2001). "Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation." *Biochimie* **83**(3-4): 319-23.
- Coux, O., K. Tanaka and A. L. Goldberg (1996). "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." *Annu Rev Biochem* **65**: 801-47.
- Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper and P. A. Wearsch (2005). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation." *Immunol Rev* **207**: 145-57.
- Cresswell, P., M. J. Androlewicz and B. Ortman (1994). "Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes." *Ciba Found Symp* **187**: 150-62; discussion 162-9.
- Dahlmann, B., F. Kopp, L. Kuehn, H. Reinauer and M. Schwenen (1986). "Studies on the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle." *Biomed Biochim Acta* **45**(11-12): 1493-501.
- Davignon, J. L., P. Castanie, J. A. Yorke, N. Gautier, D. Clement and C. Davrinche (1996). "Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro." *J Virol* **70**(4): 2162-9.
- Del-Val, M. and D. Lopez (2002). "Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8(+) T lymphocytes." *Mol Immunol* **39**(3-4): 235-47.
- Dick, T. P., N. Bangia, D. R. Peaper and P. Cresswell (2002). "Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes." *Immunity* **16**(1): 87-98.
- Dick, T. P., A. K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanovic, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee and H. Schild (1998). "Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants." *J Biol Chem* **273**(40): 25637-46.
- Doniger, J., S. Muralidhar and L. J. Rosenthal (1999). "Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate." *Clin Microbiol Rev* **12**(3): 367-82.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2001). "ER quality control: towards an understanding at the molecular level." *Curr Opin Cell Biol* **13**(4): 431-7.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 181-91.
- Ellgaard, L. and L. W. Ruddock (2005). "The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties." *EMBO Rep* **6**(1): 28-32.
- Elliott, J. G., J. D. Oliver and S. High (1997). "The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins." *J Biol Chem* **272**(21): 13849-55.
- Elliott, T. and A. Williams (2005). "The optimization of peptide cargo bound to MHC class I molecules by the peptide-loading complex." *Immunol Rev* **207**: 89-99.
- Emery, V. C., A. V. Cope, E. F. Bowen, D. Gor and P. D. Griffiths (1999). "The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo." *J Exp Med* **190**(2): 177-82.
- Evnouchidou, I., F. Momburg, A. Papakyriakou, A. Chroni, L. Leondiadis, S. C. Chang, A. L. Goldberg and E. Stratikos (2008). "The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1." *PLoS ONE* **3**(11): e3658.
- Falk, K. and O. Rotzschke (1993). "Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules." *Semin Immunol* **5**(2): 81-94.
- Fehling, H. J., W. Swat, C. Laplace, R. Kuhn, K. Rajewsky, U. Muller and H. von Boehmer (1994). "MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7." *Science* **265**(5176): 1234-7.

- Firat, E., J. Huai, L. Saveanu, S. Gaedicke, P. Aichele, K. Eichmann, P. van Endert and G. Niedermann (2007a). "Analysis of direct and cross-presentation of antigens in TPPII knockout mice." *J Immunol* **179**(12): 8137-45.
- Firat, E., L. Saveanu, P. Aichele, P. Staeheli, J. Huai, S. Gaedicke, A. Nil, G. Besin, B. Kanzler, P. van Endert and G. Niedermann (2007b). "The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation." *J Immunol* **178**(4): 2241-8.
- Frentzel, S., B. Pesold-Hurt, A. Seelig and P. M. Klotzel (1994). "20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes." *J Mol Biol* **236**(4): 975-81.
- Frickel, E. M., R. Riek, I. Jelesarov, A. Helenius, K. Wuthrich and L. Ellgaard (2002). "TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 1954-9.
- Fruci, D., S. Ferracuti, M. Z. Limongi, V. Cunsolo, E. Giorda, R. Fraioli, L. Sibilio, O. Carroll, A. Hattori, P. M. van Endert and P. Giacomini (2006). "Expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases in EBV-B cell lines from healthy donors and in leukemia/lymphoma, carcinoma, and melanoma cell lines." *J Immunol* **176**(8): 4869-79.
- Fruci, D., P. Giacomini, M. R. Nicotra, M. Forloni, R. Fraioli, L. Saveanu, P. van Endert and P. G. Natali (2008). "Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues." *J Cell Physiol* **216**(3): 742-9.
- Fruci, D., G. Lauvau, L. Saveanu, M. Amicosante, R. H. Butler, A. Polack, F. Ginhoux, F. Lemonnier, H. Firat and P. M. van Endert (2003). "Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport." *J Immunol* **170**(6): 2977-84.
- Fruci, D., G. Niedermann, R. H. Butler and P. M. van Endert (2001). "Efficient MHC class I-independent amino-terminal trimming of epitope precursor peptides in the endoplasmic reticulum." *Immunity* **15**(3): 467-76.
- Fulop, V., Z. Bocskei and L. Polgar (1998). "Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis." *Cell* **94**(2): 161-70.
- Gao, B., R. Adhikari, M. Howarth, K. Nakamura, M. C. Gold, A. B. Hill, R. Knee, M. Michalak and T. Elliott (2002). "Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin." *Immunity* **16**(1): 99-109.
- Garbi, N., G. Hammerling and S. Tanaka (2007). "Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes." *Curr Opin Immunol* **19**(1): 99-105.
- Garbi, N., S. Tanaka, F. Momburg and G. J. Hammerling (2006). "Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57." *Nat Immunol* **7**(1): 93-102.
- Geier, E., G. Pfeifer, M. Wilm, M. Lucchiarini-Hartz, W. Baumeister, K. Eichmann and G. Niedermann (1999). "A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome." *Science* **283**(5404): 978-81.
- Gilbert, M. J., S. R. Riddell, B. Plachter and P. D. Greenberg (1996). "Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product." *Nature* **383**(6602): 720-2.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.
- Golab, J., T. M. Bauer, V. Daniel and C. Nujokat (2004). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in the diagnosis of human diseases." *Clin Chim Acta* **340**(1-2): 27-40.
- Goldberg, A. L., P. Cascio, T. Saric and K. L. Rock (2002). "The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides." *Mol Immunol* **39**(3-4): 147-64.
- Goldberg, A. L. and K. L. Rock (1992). "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation." *Nature* **357**(6377): 375-9.
- Goldwich, A., S. S. Hahn, S. Schreiber, S. Meier, E. Kampgen, R. Wagner, M. B. Lutz and U. Schubert (2008). "Targeting HIV-1 Gag into the defective ribosomal product pathway enhances MHC class I antigen presentation and CD8+ T cell activation." *J Immunol* **180**(1): 372-82.
- Goto, Y., A. Hattori, Y. Ishii and M. Tsujimoto (2006). "Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1." *FEBS Lett* **580**(7): 1833-8.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology* **52**(2): 456-67.
- Groettrup, M., T. Ruppert, L. Kuehn, M. Seeger, S. Standera, U. Koszinowski and P. M. Klotzel (1995). "The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro." *J Biol Chem* **270**(40): 23808-15.
- Groettrup, M., A. Soza, U. Kuckelkorn and P. M. Klotzel (1996). "Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency." *Immunol Today* **17**(9): 429-35.

- Gromme, M., R. van der Valk, K. Sliedregt, L. Vernie, R. Liskamp, G. Hammerling, J. O. Koopmann, F. Momburg and J. Neeffes (1997). "The rational design of TAP inhibitors using peptide substrate modifications and peptidomimetics." *Eur J Immunol* **27**(4): 898-904.
- Guil, S., M. Rodriguez-Castro, F. Aguilar, E. M. Villasevil, L. C. Anton and M. Del Val (2006). "Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental." *J Biol Chem* **281**(52): 39925-34.
- Hammer, G. E., F. Gonzalez, M. Champsaur, D. Cado and N. Shastri (2006). "The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules." *Nat Immunol* **7**(1): 103-12.
- Hammer, G. E., F. Gonzalez, E. James, H. Nolla and N. Shastri (2007a). "In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides." *Nat Immunol* **8**(1): 101-8.
- Hammer, G. E., T. Kanaseki and N. Shastri (2007b). "The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire." *Immunity* **26**(4): 397-406.
- Hattori, A., K. Kitatani, H. Matsumoto, S. Miyazawa, T. Rogi, N. Tsuruoka, S. Mizutani, Y. Natori and M. Tsujimoto (2000). "Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells." *J Biochem (Tokyo)* **128**(5): 755-62.
- Hattori, A., H. Matsumoto, S. Mizutani and M. Tsujimoto (1999). "Molecular cloning of adipocyte-derived leucine aminopeptidase highly related to placental leucine aminopeptidase/oxytocinase." *J Biochem (Tokyo)* **125**(5): 931-8.
- Hattori, A. and M. Tsujimoto (2004). "Processing of antigenic peptides by aminopeptidases." *Biol Pharm Bull* **27**(6): 777-80.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* **67**: 425-79.
- Hershko, A., D. Ganoth, J. Pehrson, R. E. Palazzo and L. H. Cohen (1991). "Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts." *J Biol Chem* **266**(25): 16376-9.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hilt, W. and D. H. Wolf (1995). "[Proteasomes. Complex proteases lead to a new understanding of cellular regulation through proteolysis]." *Naturwissenschaften* **82**(6): 257-68.
- Ho, W. Y., H. N. Nguyen, M. Wolfl, J. Kuball and P. D. Greenberg (2006). "In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire." *J Immunol Methods* **310**(1-2): 40-52.
- Honess, R. W. and B. Roizman (1975). "Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(4): 1276-80.
- Hopsu, V. K., U. M. Kantonen and G. G. Glenner (1964). "A Peptidase from Rat Tissues Selectively Hydrolyzing N-Terminal Arginine and Lysine Residues." *Life Sci* **3**: 1449-53.
- Hough, R., G. Pratt and M. Rechsteiner (1986). "Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates." *J Biol Chem* **261**(5): 2400-8.
- Huai, J., E. Firat, A. Nil, D. Million, S. Gaedicke, B. Kanzler, M. Freudenberg, P. van Endert, G. Kohler, H. L. Pahl, P. Aichele, K. Eichmann and G. Niedermann (2008). "Activation of cellular death programs associated with immunosenescence-like phenotype in TPP2 knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(13): 5177-82.
- Johnstone, C. and M. Del Val (2007). "Traffic of proteins and peptides across membranes for immunosurveillance by CD8(+) T lymphocytes: a topological challenge." *Traffic* **8**(11): 1486-94.
- Juckem, L. K., K. W. Boehme, A. L. Feire and T. Compton (2008). "Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells." *J Immunol* **180**(7): 4965-77.
- Kalejta, R. F. (2008). "Tegument proteins of human cytomegalovirus." *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(2): 249-65, table of contents.
- Kanaseki, T., N. Blanchard, G. E. Hammer, F. Gonzalez and N. Shastri (2006). "ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum." *Immunity* **25**(5): 795-806.
- Kanaseki, T. and N. Shastri (2008). "Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing regulates quality of processed peptides presented by MHC class I molecules." *J Immunol* **181**(9): 6275-82.
- Karsten, S. L., T. K. Sang, L. T. Gehman, S. Chatterjee, J. Liu, G. M. Lawless, S. Sengupta, R. W. Berry, J. Pomakian, H. S. Oh, C. Schulz, K. S. Hui, M. Wiedau-Pazos, H. V. Vinters, L. I. Binder, D. H. Geschwind and G. R. Jackson (2006). "A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration." *Neuron* **51**(5): 549-60.
- Kern, F., I. P. Surel, C. Brock, B. Freistedt, H. Radtke, A. Scheffold, R. Blaszyk, P. Reinke, J. Schneider-Mergener, A. Radbruch, P. Walden and H. D. Volk (1998). "T-cell epitope mapping by flow cytometry." *Nat Med* **4**(8): 975-8.
- Kessler, B., X. Hong, J. Petrovic, A. Borodovsky, N. P. Dantuma, M. Bogoy, H. S. Overkleeft, H. Ploegh and R. Glas (2003). "Pathways accessory to proteasomal proteolysis are less efficient in major histocompatibility complex class I antigen production." *J Biol Chem* **278**(12): 10013-21.

- Khan, S., R. de Giuli, G. Schmidtke, M. Bruns, M. Buchmeier, M. van den Broek and M. Groettrup (2001). "Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein." *J Immunol* **167**(9): 4801-4.
- Kim, J. H., S. Y. Sohn, T. S. Benedict Yen and B. Y. Ahn (2008). "Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of hepatitis B virus X protein." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(4): 1036-42.
- Kim, S. I., A. Pabon, T. A. Swanson and M. J. Glucksman (2003). "Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class I expression by the endopeptidase EC3.4.24.15 (thimet oligopeptidase)." *Biochem J* **375**(Pt 1): 111-20.
- Kisselev, A. F., T. N. Akopian, K. M. Woo and A. L. Goldberg (1999). "The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation." *J Biol Chem* **274**(6): 3363-71.
- Kloetzel, P. M. (2001). "Antigen processing by the proteasome." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 179-87.
- Kloetzel, P. M. (2004a). "Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII." *Nat Immunol* **5**(7): 661-9.
- Kloetzel, P. M. (2004b). "The proteasome and MHC class I antigen processing." *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 225-33.
- Kloetzel, P. M. and F. Ossendorp (2004). "Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation." *Curr Opin Immunol* **16**(1): 76-81.
- Koch, J. and R. Tampe (2006). "The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation." *Cell Mol Life Sci* **63**(6): 653-62.
- Koldamova, R. P., I. M. Lefterov, V. G. Gadjeva and J. S. Lazo (1998). "Essential binding and functional domains of human bleomycin hydrolase." *Biochemistry* **37**(8): 2282-90.
- Komlosch, A., F. Momburg, T. Weinschenk, N. Emmerich, H. Schild, E. Nadav, I. Shaked and Y. Reiss (2001). "A role for a novel luminal endoplasmic reticulum aminopeptidase in final trimming of 26 S proteasome-generated major histocompatibility complex class I antigenic peptides." *J Biol Chem* **276**(32): 30050-6.
- Koopmann, J. O., M. Post, J. J. Neefjes, G. J. Hammerling and F. Momburg (1996). "Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP)." *Eur J Immunol* **26**(8): 1720-8.
- Kruger, E., U. Kuckelkorn, A. Sijts and P. M. Kloetzel (2003). "The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **148**: 81-104.
- Kuckelkorn, U., S. Frentzel, R. Kraft, S. Kostka, M. Groettrup and P. M. Kloetzel (1995). "Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma." *Eur J Immunol* **25**(9): 2605-11.
- Kunisawa, J. and N. Shastri (2003). "The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway." *Mol Cell* **12**(3): 565-76.
- Kunisawa, J. and N. Shastri (2006). "Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway." *Immunity* **24**(5): 523-34.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lauvau, G., K. Kakimi, G. Niedermann, M. Ostankovitch, P. Yotnda, H. Firat, F. V. Chisari and P. M. van Endert (1999). "Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells." *J Exp Med* **190**(9): 1227-40.
- Lefterov, I. M., R. P. Koldamova and J. S. Lazo (2000). "Human bleomycin hydrolase regulates the secretion of amyloid precursor protein." *Faseb J* **14**(12): 1837-47.
- Lehner, P. J., M. J. Surman and P. Cresswell (1998). "Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220." *Immunity* **8**(2): 221-31.
- Levy, F., L. Burri, S. Morel, A. L. Peitrequin, N. Levy, A. Bachi, U. Hellman, B. J. Van den Eynde and C. Servis (2002). "The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases." *J Immunol* **169**(8): 4161-71.
- Lew, R. A., T. J. Tetaz, M. J. Glucksman, J. L. Roberts and A. I. Smith (1994). "Evidence for a two-step mechanism of gonadotropin-releasing hormone metabolism by prolyl endopeptidase and metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 in ovine hypothalamic extracts." *J Biol Chem* **269**(17): 12626-32.
- Luckey, C. J., G. M. King, J. A. Marto, S. Venketeswaran, B. F. Maier, V. L. Crotzer, T. A. Colella, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and V. H. Engelhard (1998). "Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol." *J Immunol* **161**(1): 112-21.
- Macagno, A., M. Gilliet, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, F. O. Nestle and M. Groettrup (1999). "Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation." *Eur J Immunol* **29**(12): 4037-42.
- Marcilla, M., E. M. Villasevil and J. A. de Castro (2008). "Tripeptidyl peptidase II is dispensable for the generation of both proteasome-dependent and proteasome-independent ligands of HLA-B27 and other class I molecules." *Eur J Immunol* **38**(3): 631-9.

- Marti, T., O. Molberg, Q. Li, G. M. Gray, C. Khosla and L. M. Sollid (2005). "Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization." *J Pharmacol Exp Ther* **312**(1): 19-26.
- Matsui, M., J. H. Fowler and L. L. Walling (2006). "Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function." *Biol Chem* **387**(12): 1535-44.
- McLaughlin-Taylor, E., H. Pande, S. J. Forman, B. Tanamachi, C. R. Li, J. A. Zaia, P. D. Greenberg and S. R. Riddell (1994). "Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes." *J Med Virol* **43**(1): 103-10.
- Medd, P. G. and B. M. Chain (2000). "Protein degradation in MHC class II antigen presentation: opportunities for immunomodulation." *Semin Cell Dev Biol* **11**(3): 203-10.
- Meng, L., R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin and C. M. Crews (1999). "Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10403-8.
- Mettenleiter, T. C. (2002). "Herpesvirus assembly and egress." *J Virol* **76**(4): 1537-47.
- Michaelis, M., H. W. Doerr and J. Cinatl (2009). "The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions." *Neoplasia* **11**(1): 1-9.
- Miyashita, H., T. Yamazaki, T. Akada, O. Niizeki, M. Ogawa, S. Nishikawa and Y. Sato (2002). "A mouse orthologue of puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase is expressed in endothelial cells and plays an important role in angiogenesis." *Blood* **99**(9): 3241-9.
- Mo, A. X., S. F. van Lelyveld, A. Craiu and K. L. Rock (2000). "Sequences that flank subdominant and cryptic epitopes influence the proteolytic generation of MHC class I-presented peptides." *J Immunol* **164**(8): 4003-10.
- Mocarski, E. S., Jr. (2004). "Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system." *Cell Microbiol* **6**(8): 707-17.
- Momburg, F., J. Roelse, G. J. Hammerling and J. J. Neefjes (1994). "Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter." *J Exp Med* **179**(5): 1613-23.
- Momburg, F. and P. Tan (2002). "Tapasin-the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum." *Mol Immunol* **39**(3-4): 217-33.
- Morel, S., F. Levy, O. Burlet-Schiltz, F. Brasseur, M. Probst-Kepper, A. L. Peitrequin, B. Monsarrat, R. Van Velthoven, J. C. Cerottini, T. Boon, J. E. Gairin and B. J. Van den Eynde (2000). "Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells." *Immunity* **12**(1): 107-17.
- Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka and A. Ichihara (1992). "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination." *Nature* **360**(6404): 597-9.
- Neefjes, J., E. Gottfried, J. Roelse, M. Gromme, R. Obst, G. J. Hammerling and F. Momburg (1995). "Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters." *Eur J Immunol* **25**(4): 1133-6.
- Neisig, A., J. Roelse, A. J. Sijts, F. Ossendorp, M. C. Feltkamp, W. M. Kast, C. J. Melief and J. J. Neefjes (1995). "Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences." *J Immunol* **154**(3): 1273-9.
- Neumann, L. and R. Tampe (1999). "Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding." *J Mol Biol* **294**(5): 1203-13.
- Nussbaum, A. K., M. P. Rodriguez-Carreno, N. Benning, J. Botten and J. L. Whitton (2005). "Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination." *J Immunol* **175**(2): 1153-60.
- Odeberg, J., B. Plachter, L. Branden and C. Soderberg-Naucler (2003). "Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain." *Blood* **101**(12): 4870-7.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie and T. Sata (2003). "Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid." *J Virol* **77**(15): 8541-7.
- Orlowski, M. and S. Wilk (2000). "Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex." *Arch Biochem Biophys* **383**(1): 1-16.
- Ortmann, B., J. Copeman, P. J. Lehner, B. Sadasivan, J. A. Herberg, A. G. Grandea, S. R. Riddell, R. Tampe, T. Spies, J. Trowsdale and P. Cresswell (1997). "A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes." *Science* **277**(5330): 1306-9.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg and T. Maniatis (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." *Cell* **78**(5): 773-85.
- Park, B., S. Lee, E. Kim and K. Ahn (2003). "A single polymorphic residue within the peptide-binding cleft of MHC class I molecules determines spectrum of tapasin dependence." *J Immunol* **170**(2): 961-8.
- Park, B., S. Lee, E. Kim, K. Cho, S. R. Riddell, S. Cho and K. Ahn (2006). "Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing." *Cell* **127**(2): 369-82.

- Paz, P., N. Brouwenstijn, R. Perry and N. Shastri (1999). "Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER." *Immunity* **11**(2): 241-51.
- Peaper, D. R. and P. Cresswell (2008a). "The redox activity of ERp57 is not essential for its functions in MHC class I peptide loading." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10477-82.
- Peaper, D. R. and P. Cresswell (2008b). "Regulation of MHC class I assembly and peptide binding." *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 343-68.
- Peaper, D. R., P. A. Wearsch and P. Cresswell (2005). "Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex." *Embo J* **24**(20): 3613-23.
- Peh, C. A., S. R. Burrows, M. Barnden, R. Khanna, P. Cresswell, D. J. Moss and J. McCluskey (1998). "HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading." *Immunity* **8**(5): 531-42.
- Peters, B., K. Janek, U. Kuckelkorn and H. G. Holzthutter (2002). "Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation." *J Mol Biol* **318**(3): 847-62.
- Peters, J. M., Z. Cejka, J. R. Harris, J. A. Kleinschmidt and W. Baumeister (1993). "Structural features of the 26 S proteasome complex." *J Mol Biol* **234**(4): 932-7.
- Pham, V. L., M. S. Cadel, C. Gouzy-Darmon, C. Hanquez, M. C. Beinfeld, P. Nicolas, C. Etchebest and T. Foulon (2007). "Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn²⁺-binding motif and molecular modelling." *BMC Biochem* **8**: 21.
- Pickart, C. M. and M. J. Eddins (2004). "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms." *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 55-72.
- Piesse, C., M. Tymms, E. Garrafa, C. Gouzy, M. Lacasa, S. Cadel, P. Cohen and T. Foulon (2002). "Human aminopeptidase B (rnpep) on chromosome 1q32.2: complementary DNA, genomic structure and expression." *Gene* **292**(1-2): 129-40.
- Plachter, B., S. Klages, S. Hagelmann, W. Britt, M. P. Landini and G. Jahn (1990). "Procaryotic expression of phosphorylated tegument protein pp65 of human cytomegalovirus and application of recombinant peptides for immunoblot analyses." *J Clin Microbiol* **28**(6): 1229-35.
- Plachter, B., C. Sinzger and G. Jahn (1996). "Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus." *Adv Virus Res* **46**: 195-261.
- Pollock, S., G. Kozlov, M. F. Pelletier, J. F. Trempe, G. Jansen, D. Sitnikov, J. J. Bergeron, K. Gehring, I. Ekiel and D. Y. Thomas (2004). "Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system." *Embo J* **23**(5): 1020-9.
- Preiser, W., C. Fleckenstein and H. W. Doerr (2004). "[New methods for the diagnosis of cytomegalovirus]." *Dtsch Med Wochenschr* **129**(27): 1509-12.
- Princiotta, M. F., D. Finzi, S. B. Qian, J. Gibbs, S. Schuchmann, F. Buttgerit, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2003). "Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing." *Immunity* **18**(3): 343-54.
- Procko, E. and R. Gaudet (2009). "Antigen processing and presentation: TAPping into ABC transporters." *Curr Opin Immunol*.
- Rammensee, H. G., K. Falk and O. Rotzschke (1993). "Peptides naturally presented by MHC class I molecules." *Annu Rev Immunol* **11**: 213-44.
- Reits, E., A. Griekspoor, J. Neijssen, T. Groothuis, K. Jalink, P. van Veelen, H. Janssen, J. Calafat, J. W. Drijfhout and J. Neefjes (2003). "Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I." *Immunity* **18**(1): 97-108.
- Reits, E., J. Neijssen, C. Herberts, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J. W. Drijfhout and J. Neefjes (2004). "A major role for TPPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation." *Immunity* **20**(4): 495-506.
- Reits, E. A., J. C. Vos, M. Gromme and J. Neefjes (2000). "The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins." *Nature* **404**(6779): 774-8.
- Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang and A. L. Goldberg (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." *Cell* **78**(5): 761-71.
- Rock, K. L., I. A. York and A. L. Goldberg (2004). "Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation." *Nat Immunol* **5**(7): 670-7.
- Rock, K. L., I. A. York, T. Saric and A. L. Goldberg (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." *Adv Immunol* **80**: 1-70.
- Roelse, J., M. Gromme, F. Momburg, G. Hammerling and J. Neefjes (1994). "Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling." *J Exp Med* **180**(5): 1591-7.
- Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi and K. Wolf (1981). "Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses." *Intervirology* **16**(4): 201-17.

- Rufer, E., R. M. Leonhardt and M. R. Knittler (2007). "Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex." *J Immunol* **179**(9): 5717-27.
- Russell, J. H. and T. J. Ley (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **20**: 323-70.
- Salter, R. D. and P. Cresswell (1986). "Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid." *Embo J* **5**(5): 943-9.
- Salter, R. D., D. N. Howell and P. Cresswell (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids." *Immunogenetics* **21**(3): 235-46.
- Saric, T., J. Beninga, C. I. Graef, T. N. Akopian, K. L. Rock and A. L. Goldberg (2001). "Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase." *J Biol Chem* **276**(39): 36474-81.
- Saric, T., S. C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto and A. L. Goldberg (2002). "An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides." *Nat Immunol* **3**(12): 1169-76.
- Saric, T., C. I. Graef and A. L. Goldberg (2004). "Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases." *J Biol Chem* **279**(45): 46723-32.
- Saveanu, L., O. Carroll, V. Lindo, M. Del Val, D. Lopez, Y. Lepelletier, F. Greer, L. Schomburg, D. Fruci, G. Niedermann and P. M. van Endert (2005). "Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum." *Nat Immunol* **6**(7): 689-97.
- Schmitt, L. and R. Tampe (2000). "Affinity, specificity, diversity: a challenge for the ABC transporter TAP in cellular immunity." *ChemBiochem* **1**(1): 16-35.
- Schmolke, S., P. Drescher, G. Jahn and B. Plachter (1995a). "Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport." *J Virol* **69**(2): 1071-8.
- Schmolke, S., H. F. Kern, P. Drescher, G. Jahn and B. Plachter (1995b). "The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture." *J Virol* **69**(10): 5959-68.
- Schoenhals, G. J., R. M. Krishna, A. G. Grandea, 3rd, T. Spies, P. A. Peterson, Y. Yang and K. Fruh (1999). "Retention of empty MHC class I molecules by tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells." *Embo J* **18**(3): 743-53.
- Schubert, U., L. C. Anton, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell and J. R. Bennink (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." *Nature* **404**(6779): 770-4.
- Schulz, I., U. Zeitschel, T. Rudolph, D. Ruiz-Carrillo, J. U. Rahfeld, B. Gerhartz, V. Bigl, H. U. Demuth and S. Rossner (2005). "Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion." *J Neurochem* **94**(4): 970-9.
- Schwarz, K., M. van Den Broek, S. Kostka, R. Kraft, A. Soza, G. Schmidtke, P. M. Klotzel and M. Groettrup (2000). "Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope." *J Immunol* **165**(2): 768-78.
- Seifert, U., C. Maranon, A. Shmueli, J. F. Desoutter, L. Wesoloski, K. Janek, P. Henklein, S. Diescher, M. Andrieu, H. de la Salle, T. Weinschenk, H. Schild, D. Laderach, A. Galy, G. Haas, P. M. Klotzel, Y. Reiss and A. Hosmalin (2003). "An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope." *Nat Immunol* **4**(4): 375-9.
- Serwold, T., S. Gaw and N. Shastri (2001). "ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules." *Nat Immunol* **2**(7): 644-51.
- Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob and N. Shastri (2002). "ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum." *Nature* **419**(6906): 480-3.
- Shin, E. C., U. Seifert, T. Kato, C. M. Rice, S. M. Feinstone, P. M. Klotzel and B. Rehermann (2006). "Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection." *J Clin Invest* **116**(11): 3006-14.
- Shin, E. C., U. Seifert, S. Urban, K. T. Truong, S. M. Feinstone, C. M. Rice, P. M. Klotzel and B. Rehermann (2007). "Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver." *J Interferon Cytokine Res* **27**(12): 985-90.
- Sibille, C., K. G. Gould, K. Willard-Gallo, S. Thomson, A. J. Rivett, S. Powis, G. W. Butcher and P. De Baetselier (1995). "LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes." *Curr Biol* **5**(8): 923-30.
- Sieker, F., S. Springer and M. Zacharias (2007). "Comparative molecular dynamics analysis of tapasin-dependent and -independent MHC class I alleles." *Protein Sci* **16**(2): 299-308.
- Sieker, F., T. P. Straatsma, S. Springer and M. Zacharias (2008). "Differential tapasin dependence of MHC class I molecules correlates with conformational changes upon peptide dissociation: a molecular dynamics simulation study." *Mol Immunol* **45**(14): 3714-22.
- Sijts, A. J., T. Ruppert, B. Rehermann, M. Schmidt, U. Koszinowski and P. M. Klotzel (2000a). "Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes." *J Exp Med* **191**(3): 503-14.

- Sijts, A. J., S. Standera, R. E. Toes, T. Ruppert, N. J. Beekman, P. A. van Veelen, F. A. Ossendorp, C. J. Melief and P. M. Kloetzel (2000b). "MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells." *J Immunol* **164**(9): 4500-6.
- Sinclair, J. and P. Sissons (2006). "Latency and reactivation of human cytomegalovirus." *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 1763-79.
- Spies, T., V. Cerundolo, M. Colonna, P. Cresswell, A. Townsend and R. DeMars (1992). "Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer." *Nature* **355**(6361): 644-6.
- Stavropoulou, V., V. Vasquez, B. Cereser, E. Freda and M. G. Masucci (2006). "TPPII promotes genetic instability by allowing the escape from apoptosis of cells with activated mitotic checkpoints." *Biochem Biophys Res Commun* **346**(2): 415-25.
- Stoltze, L., T. P. Dick, M. Deeg, B. Pommerl, H. G. Rammensee and H. Schild (1998). "Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities." *Eur J Immunol* **28**(12): 4029-36.
- Stoltze, L., M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M. W. Thompson, L. B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H. G. Rammensee and H. Schild (2000). "Two new proteases in the MHC class I processing pathway." *Nat Immunol* **1**(5): 413-8.
- Strehl, B., T. Joeris, M. Rieger, A. Visekruna, K. Textoris-Taube, S. H. Kaufmann, P. M. Kloetzel, U. Kuckelkorn and U. Steinhoff (2006). "Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8⁺ T cells." *J Immunol* **177**(9): 6238-44.
- Strehl, B., K. Textoris-Taube, S. Jakel, A. Voigt, P. Henklein, U. Steinhoff, P. M. Kloetzel and U. Kuckelkorn (2008). "Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage." *J Biol Chem* **283**(26): 17891-7.
- Suzuki, R., K. Moriishi, K. Fukuda, M. Shirakura, K. Ishii, I. Shoji, T. Wakita, T. Miyamura, Y. Matsuura and T. Suzuki (2009). "Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism." *J Virol* **83**(5): 2389-92.
- Tan, P., H. Kropshofer, O. Mandelboim, N. Bulbuc, G. J. Hammerling and F. Momburg (2002). "Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading." *J Immunol* **168**(4): 1950-60.
- Tanahashi, N., Y. Murakami, Y. Minami, N. Shimbara, K. B. Hendil and K. Tanaka (2000). "Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis." *J Biol Chem* **275**(19): 14336-45.
- Tanaka, K., K. Ii, A. Ichihara, L. Waxman and A. L. Goldberg (1986). "A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution." *J Biol Chem* **261**(32): 15197-203.
- Tanioka, T., A. Hattori, S. Masuda, Y. Nomura, H. Nakayama, S. Mizutani and M. Tsujimoto (2003). "Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases." *J Biol Chem* **278**(34): 32275-83.
- Tanioka, T., A. Hattori, S. Mizutani and M. Tsujimoto (2005). "Regulation of the human leukocyte-derived arginine aminopeptidase/endoplasmic reticulum-aminopeptidase 2 gene by interferon-gamma." *Febs J* **272**(4): 916-28.
- Toes, R. E., A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwiderman, T. P. Dick, J. Muller, B. Schonfisch, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee and H. Schild (2001). "Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products." *J Exp Med* **194**(1): 1-12.
- Towne, C. F., I. A. York, J. Neijssen, M. L. Karow, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, J. J. Neefjes and K. L. Rock (2005). "Leucine aminopeptidase is not essential for trimming peptides in the cytosol or generating epitopes for MHC class I antigen presentation." *J Immunol* **175**(10): 6605-14.
- Towne, C. F., I. A. York, J. Neijssen, M. L. Karow, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, J. J. Neefjes and K. L. Rock (2008). "Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections." *J Immunol* **180**(3): 1704-12.
- Towne, C. F., I. A. York, L. B. Watkin, J. S. Lazo and K. L. Rock (2007). "Analysis of the role of bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses." *J Immunol* **178**(11): 6923-30.
- Tsujimoto, M. and A. Hattori (2005). "The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases." *Biochim Biophys Acta* **1751**(1): 9-18.
- Uebel, S., W. Kraas, S. Kienle, K. H. Wiesmuller, G. Jung and R. Tampe (1997). "Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17): 8976-81.
- Uebel, S., T. H. Meyer, W. Kraas, S. Kienle, G. Jung, K. H. Wiesmuller and R. Tampe (1995). "Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries." *J Biol Chem* **270**(31): 18512-6.

- Uebel, S. and R. Tampe (1999). "Specificity of the proteasome and the TAP transporter." *Curr Opin Immunol* **11**(2): 203-8.
- Van den Eynde, B. J. and S. Morel (2001). "Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome." *Curr Opin Immunol* **13**(2): 147-53.
- van Endert, P. M., D. Riganelli, G. Greco, K. Fleischhauer, J. Sidney, A. Sette and J. F. Bach (1995). "The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing." *J Exp Med* **182**(6): 1883-95.
- van Endert, P. M., R. Tampe, T. H. Meyer, R. Tisch, J. F. Bach and H. O. McDevitt (1994). "A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing." *Immunity* **1**(6): 491-500.
- van Hall, T., A. Sijts, M. Camps, R. Offringa, C. Melief, P. M. Kloetzel and F. Ossendorp (2000). "Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28." *J Exp Med* **192**(4): 483-94.
- Van Kaer, L., P. G. Ashton-Rickardt, M. Eichelberger, M. Gaczynska, K. Nagashima, K. L. Rock, A. L. Goldberg, P. C. Doherty and S. Tonegawa (1994). "Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice." *Immunity* **1**(7): 533-41.
- Venäläinen, J. I., J. A. Garcia-Horsman, M. M. Forsberg, A. Jalkanen, E. A. Wallen, E. M. Jarho, J. A. Christiaans, J. Gynther and P. T. Mannisto (2006). "Binding kinetics and duration of in vivo action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors." *Biochem Pharmacol* **71**(5): 683-92.
- Voges, D., P. Zwickl and W. Baumeister (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-68.
- Voigt, A., U. Salzmann, U. Seifert, M. Dathe, A. Soza, P. M. Kloetzel and U. Kuckelkorn (2007). "20S proteasome-dependent generation of an IEpp89 murine cytomegalovirus-derived H-2L(d) epitope from a recombinant protein." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(2): 549-54.
- Wang, J. and M. A. Maldonado (2006). "The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases." *Cell Mol Immunol* **3**(4): 255-61.
- Wearsch, P. A. and P. Cresswell (2007). "Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer." *Nat Immunol* **8**(8): 873-81.
- Weekes, M. P., M. R. Wills, K. Mynard, A. J. Carmichael and J. G. Sissons (1999). "The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo." *J Virol* **73**(3): 2099-108.
- Wei, M. L. and P. Cresswell (1992). "HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides." *Nature* **356**(6368): 443-6.
- Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 169-78.
- Wenzel, T., C. Eckerskorn, F. Lottspeich and W. Baumeister (1994). "Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products." *FEBS Lett* **349**(2): 205-9.
- Wilk, S. (1983). "Prolyl endopeptidase." *Life Sci* **33**(22): 2149-57.
- Wilkinson, K. D., M. K. Urban and A. L. Haas (1980). "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes." *J Biol Chem* **255**(16): 7529-32.
- Wills, M. R., A. J. Carmichael, K. Mynard, X. Jin, M. P. Weekes, B. Plachter and J. G. Sissons (1996). "The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL." *J Virol* **70**(11): 7569-79.
- Wojcik, C. and G. N. DeMartino (2003). "Intracellular localization of proteasomes." *Int J Biochem Cell Biol* **35**(5): 579-89.
- Wright, C. A., P. Kozik, M. Zacharias and S. Springer (2004). "Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex." *Biol Chem* **385**(9): 763-78.
- Yan, J., V. V. Parekh, Y. Mendez-Fernandez, D. Olivares-Villagomez, S. Dragovic, T. Hill, D. C. Roopenian, S. Joyce and L. Van Kaer (2006). "In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules." *J Exp Med* **203**(3): 647-59.
- Yewdell, J. (2002). "To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins." *Mol Immunol* **39**(3-4): 139-46.
- Yewdell, J. W., E. Reits and J. Neefjes (2003). "Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 952-61.
- York, I. A., N. Bhutani, S. Zendzian, A. L. Goldberg and K. L. Rock (2006a). "Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation." *J Immunol* **177**(3): 1434-43.
- York, I. A., M. A. Brehm, S. Zendzian, C. F. Towne and K. L. Rock (2006b). "Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- York, I. A., S. C. Chang, T. Saric, J. A. Keys, J. M. Favreau, A. L. Goldberg and K. L. Rock (2002). "The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues." *Nat Immunol* **3**(12): 1177-84.

- York, I. A., A. L. Goldberg, X. Y. Mo and K. L. Rock (1999). "Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation." *Immunol Rev* **172**: 49-66.
- York, I. A., A. X. Mo, K. Lemerise, W. Zeng, Y. Shen, C. R. Abraham, T. Saric, A. L. Goldberg and K. L. Rock (2003). "The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation." *Immunity* **18**(3): 429-40.
- Yuksek, K., W. L. Chen, D. Chien and J. H. Ou (2009). "Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein." *J Virol* **83**(2): 612-21.
- Zaia, J. A. (1990). "Epidemiology and pathogenesis of cytomegalovirus disease." *Semin Hematol* **27**(2 Suppl 1): 5-10; discussion 28-9.
- Zernich, D., A. W. Purcell, W. A. Macdonald, L. Kjer-Nielsen, L. K. Ely, N. Laham, T. Crockford, N. A. Mifsud, M. Bharadwaj, L. Chang, B. D. Tait, R. Holdsworth, A. G. Brooks, S. P. Bottomley, T. Beddoe, C. A. Peh, J. Rossjohn and J. McCluskey (2004). "Natural HLA class I polymorphism controls the pathway of antigen presentation and susceptibility to viral evasion." *J Exp Med* **200**(1): 13-24.
- Zhang, M., C. M. Pickart and P. Coffino (2003). "Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate." *Embo J* **22**(7): 1488-96.
- Zhang, Y., E. Baig and D. B. Williams (2006). "Functions of ERp57 in the folding and assembly of major histocompatibility complex class I molecules." *J Biol Chem* **281**(21): 14622-31.
- Zhu, H., Y. Shen and T. Shenk (1995). "Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis." *J Virol* **69**(12): 7960-70.
- Zweerink, H. J., M. C. Gammon, U. Utz, S. Y. Sauma, T. Harrer, J. C. Hawkins, R. P. Johnson, A. Sirotina, J. D. Hermes, B. D. Walker and et al. (1993). "Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells." *J Immunol* **150**(5): 1763-71.

Abkürzungsverzeichnis

Ad5	Adenovirus 5
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMC	Amidomethylcoumarin
Amp	Ampicillin
AP	Aminopeptidase
AP-B	Aminopeptidase B
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest	destilliertes Wasser
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BH	Bleomycin Hydrolase
BSA	bovines Serum Albumin
CRT	Calretikulin
CNX	Calnexin
CTL	zytotoxische T Lymphozyten
d	Tag
DBC	DesoxyBigChap
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dethiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
ERAPI	ER Aminopeptidase I
ERAPII	ER Aminopeptidase II
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCMV	Humaner Zytomegalievirus
HCV	Hepatitis C Virus
Hepes	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>

IFN γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
iP	Immunoproteasom
IP	Immunpräzipitation
KDa	Kilodalton
LAP	Leucyl Aminopeptidase
LB Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium (Luria Bertani)
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Massenspektrometrie
NEM	N-Ethylmaleimid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	pH-Wert (<i>potentia Hydrogenii</i>)
POP	Prolyl Oligopeptidase
pp65	Phosphoprotein 65
PSA	Pyromycin-sensitive Aminopeptidase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
sP	Standardproteasom
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Triflouressigsäure
TOP	Thimet Oligopeptidase
Tpn	Tapasin
TPPII	Tripeptidyl Peptidase II
UE	Untereinheit
ü.N.	über Nacht
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WB	Western Blot

Danksagung

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel, der mir ein freies wissenschaftliches Arbeiten unter ausgezeichneten Bedingungen an seinem Institut ermöglichte sowie Dr. Ulrike Seifert für die interessante Themenstellung und die hervorragende Betreuung.

Bei den Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses bedanke ich mich für Ihre Mühen.

Entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit leisteten F. Ossendorp (Durchführung des TAP Assays), Th. Foulon (Bereitstellung der rekombinanten AP-B), P. Cresswell und F. Momburg (Bereitstellung der Tapasin Ak), P. vanEndert und L. Saveanu (Bereitstellung der ERAP Ak), die AG Dr. Henklein (Peptidsynthese), Kathrin (Massenspektrometrie), Ingrid und Ilona (POP Klonierung und Aufreinigung) sowie Frédéric (CTL) – vielen Dank!

Allen Mitarbeitern/Innen der AG Kloetzel möchte ich für Ihre andauernde Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima danken. An dieser Stelle sei speziell dem gesamten Labor 007 für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung im Laboralltag gedankt - insbesondere durch die vielseitigen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen mit Ulrike sowie den praktischen Tipps und Tricks von Ingrid und Elke. Der Besetzung des Doktorandenraums danke ich für die Abwechslungen auf dem gemeinsamen Weg.

Vielen Dank an Annette, Tanja und Nicole aus dem Mannheimer Labor der AG Schadendorf für die Einführung in die siRNA Transfektion, wodurch diese Arbeit maßgeblich vorangetrieben wurde, sowie die freundschaftliche Verbundenheit darüber hinaus.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Peter, der sehr viel Zeit und Geduld nicht nur für das Korrekturlesen meiner Arbeit aufbrachte.

Zum Abschluß ein liebes Dankeschön an meinen Freund Martin sowie an meine Eltern und Familie für Ihre Zuversicht.

Publikationen

Artikel

Shin, E. C., Seifert, U., **Urban, S.**, Truong, K. T., Feinstone, S. M., Rice, C. M., Kloetzel, P. M., Rehmann, B. (2007): Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in hepatitis C virus-infected liver. *J Interferon Cytokine Res* 27(12): 985-90.

Ebstein, F., Lange, N., **Urban, S.**, Seifert, U., Kruger, E., Kloetzel, P. M. (2009): Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Biochem Cell Biol* 41(5): 1205-15.

Manuskript in Vorbereitung

Urban, S., Textoris-Taube, K., Reimann, B., Lehmann, T., Ebstein, F., Kessler, J.H., Janek, K., Ossendorp, F., Foulon, Th., Schadendorf, D., Kloetzel, P-M., Seifert U., Paschen, A.: Processing of the HLA-A2-restricted HCMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃ epitope by cytosolic and ER-resident aminopeptidases.

Urban, S., Ebstein, F., Kloetzel, P-M., Seifert U. *et al.*: ERAPI and ERAPII trim epitope precursor peptides independent of MHC class I molecules as part of the peptide loading complex.

Posterbeiträge

Urban, S., Textoris-Taube, K., Reimann, B., Lehmann, T., Paschen, A., Ebstein, F., Henklein, P., Schadendorf, D., Kloetzel, P-M., Seifert, U.: Role of prolyl-oligo-peptidase (POP) in MHC class I antigen processing. 20.-23. April 2007, 3rd Charité Zeuthener See workshop; Berlin-Zeuthen.

Urban, S., Textoris-Taube, K., Reimann, B., Kessler, J.H., Paschen, A., Ossendorp, F., Foulon, Th., Schadendorf, D. Kloetzel, P-M., Seifert, U.: Different role of cytosolic and ER-resident aminopeptidases in HCMVpp65 epitope generation. 03.-06. September 2008, *Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies*; Wien, Österreich.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, April 2009

Sabrina Urban